

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Microbiología de Alimentos



TESIS DOCTORAL

**Estudios de ciertos aditivos internacionales en carne y
productos carnicos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Cleydes Angelica Rodriguez Rivas

DIRECTOR:

Juan Antonio Ordóñez Pereda

Madrid, 2015

Cleydes Angelica Rodriguez Rivas

TP
1980
022



* 5 3 0 9 8 5 2 7 2 8 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-53-079529-0

ESTUDIOS DE CIERTOS ADITIVOS INTENCIONALES EN
CARNE Y PRODUCTOS CARNICOS

Facultad de Veterinaria
Departamento de Microbiología de
Alimentos
Universidad Complutense de Madrid
1980



BIBLIOTECA

© Cleydes Angelica Rodríguez Rivas
Editorial de la Universidad Complutense de Madrid
Servicio de Reprografía, Noviciado, 3-Madrid-8
Madrid, 1980
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-5516-1980

CLEYDES ANGELICA RODRIGUEZ RIVAS

"ESTUDIO DE CIERTOS ADITIVOS INTENCIONALES EN CARNE
Y PRODUCTOS CARNICOS".

Bernabé Sanz Pérez.
Catedrático de Bromatología
y Microbiología de los Alimentos.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria.

Departamento de Higiene y

Microbiología de los Alimentos.

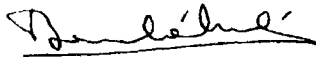
Año 1979.

BERNABE SANZ PEREZ, Catedrático de Bromatología y Microbiología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad - Complutense de Madrid,

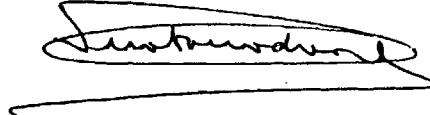
CERTIFICO:

Que la tesis titulada "ESTUDIO DE CIERTOS ADITIVOS INTENCIONALES EN CARNE Y PRODUCTOS CARNICOS", de la que es autora Dña. GLEYDES ANGELICA RODRIGUEZ RIVAS, ha sido realizada bajo la dirección conjunta del Prof. Dr. Juan Antonio Ordóñez Pereda, Adjunto de Bromatología y Microbiología de los Alimentos y del supraescrito, cumpliendo las condiciones exigidas para optar al título de Doctor en Veterinaria.

Madrid, veintiseis de Octubre de mil novecientos setenta y nueve.



El Codirector.



A mis padres.

A Angel.

AGRADECIMIENTO

La autora de esta tesis desea expresar su agradecimiento al - Prof. Dr. D. Bernabé Sanz Pérez, por la dirección de la misma y por la ayuda y orientaciones recibidas durante su realización, al Prof. Dr. O. Pascual López Lorenzo que en todo momento le alentó y al Dr. D. - Juan Antonio Ordoñez Pereda, codirector de esta tesis, cuya ayuda ha sido igualmente muy valiosa.

También desea mostrar su gratitud a Angel Blázquez Cerezo por la comprensión y ayuda de él recibidas.

A los compañeros de laboratorio y a todas aquellas personas - que de alguna manera han contribuido a la realización de la misma, les da sus más sentidas gracias.

Igualmente manifiesta públicamente su agradecimiento al Matadero Industrial "GIRESA" de Colmenar Viejo y muy especialmente a su director, Dr. José Luis Rodríguez Marín y colaboradores por las facilidades que le dieron para la toma de muestras.

Por último, aunque no por ello con menos calor, desea expresar su agradecimiento a la Fundación "Gran Mariscal de Ayacucho" de Venezuela, que al otorgarle una beca de Doctorado le proporcionó la oportunidad de elaborar el presente trabajo.

INDICE

	Pág.
CAPITULO I.- INTRODUCCION GENERAL	1
CAPITULO II.- MATERIAL, PRODUCTOS Y METODOS GENERALES.	
II.1.- MATERIAL	6
1.- Material general	6
2.- Concentraciones de volumen	7
3.- Cromatografías y electroforesis	7
II.2.- PRODUCTOS	8
1.- Reactivos y patrones	8
2.- Soportes cromatográficos y electroforéticos	8
3.- Disolventes y purificación de los mismos	9
4.- Gases	10
II.3.- METODOS	10
1.- Procedencia y toma de muestras	10
1.- Muestras procedentes de los animales	10
2.- Muestras de productos cárnicos	11
2.- Metodología específica	12
CAPITULO III.- SUSTANCIAS ANTITIROIDEAS Y ESTROGENOS DE SINTESIS.	
III.1.- INTRODUCCION	13
1.- Sustancias antitiroideas	13
1.- Recuerdo anatómico, histológico y fisiológico del tiroides	13
2.- Definición y clasificación	15
3.- Las tionamidas o tioureas: Origen y química	15
4.- Biosíntesis de las hormonas tiroideas, en rela- ción con el mecanismo de acción de las tioureas .	16

	Pág.
A) Incorporación de yoduro a tiroides ("trampa de yoduro").....	16
B) Oxidación del yoduro y fijación a la tirosina..	17
C) Formación de las hormonas tiroideas. Acoplamiento	17
D) Liberación de las hormonas tiroideas	17
5.- Acción antitiroidea	20
A) Efectos bociógenos e hipotiroideos	20
B) Diferencias en la actividad de las tioureas ...	21
C) Mecanismo de acción	21
6.- Otras acciones de las tioureas	21
7.- Absorción, destino y excreción	22
8.- Vía de administración	22
9.- Métodos analíticos	22
2.- Estrógenos de síntesis	25
1.- Actividad fisiológica y mecanismo de acción	26
2.- Destino metabólico	29
3.- Toxicología	32
4.- Métodos de análisis de estrógenos (naturales y sintéticos)	34
A) Métodos histológicos	34
B) Métodos biológicos	35
C) Métodos químicos	36
D) Métodos inmunológicos	38
III.2.- MATERIAL Y METODOS	40
1.- Determinación de sustancias antitiroideas	40

	Pág.
1.- Método cualitativo	40
A) Extracción y purificación	40
B) Reacción	41
C) Cromatografía en capa fina	42
2.- Método cuantitativo	45
A) Extracción	45
B) Cromatografía	45
1.- Empaquetado de la columna	45
2.- Desarrollo de la cromatografía	46
C) Determinación colorimétrica	46
2.- Determinación de estrógenos	49
1.- Extracción y purificación	49
2.- Identificación	50
a) Colocación de la muestra	50
b) Desarrollo de las cromatografías y revelado de de las placas	50
III.3.- RESULTADOS Y DISCUSION.....	53
1.- Sustancias antitiroideas	53
1.- Características de los animales y modificaciones macroscópicas del tiroides, musculatura cervical inferior e hígado	53
2.- Identificación de las sustancias antitiroideas ..	57
3.- Cuantificación de las sustancias antitiroideas ..	68
2.- Estrógenos de síntesis	71
1.- Identificación de los estrógenos de síntesis	71
CAPITULO IV.- GLUCONO- δ -LACTONA, PROTEINAS DE SOJA, ALMIDON Y NI	

	Pág.
TRITOS.	
IV.1.- INTRODUCCION	75
1.- Glucono- δ -lactona	75
1.- Obtención de glucono- δ -lactona	76
a) Oxidación biológica de la glucosa	76
b) Oxidación electrolítica de la glucosa	78
2.- Aplicaciones de la glucono- δ -lactona	78
3.- Empleo en la elaboración de embutidos	78
4.- Métodos analíticos	82
2.- Proteínas de soja	83
1.- Estructura	84
2.- Propiedades físicas y químicas	85
a) Solubilidad en función del pH	85
b) Desnaturalización	86
1.- Desnaturalización por el calor	86
2.- Desnaturalización por ácidos o álcalis	88
c) Aminoácidos de las proteínas de soja	88
3.- Formas de proteínas de soja	90
a) Soja entera	90
b) Productos de proteínas de soja procesados	90
1.- Harinas y gránulos de soja	91
2.- "Concentrados proteicos" de soja	91
3.- Proteínas "aisladas" de soja	92
4.- Propiedades funcionales	93
a) Emulsificación	93
b) Retención de grasa	94

	Pág.
c) Absorción de agua	95
d) Textura	96
e) Formación de masa	97
f) Adhesión, cohesión y elasticidad	97
g) Formación de película	97
5.- Propiedades nutricionales	98
6.- Métodos para la detección y determinación de pro - teínas de soja en productos cárnicos	98
A) Métodos serológicos	99
B) Métodos histológicos	99
C) Métodos electroforéticos	100
3.- Almidón	100
1.- Estructura molecular	101
A) Amilosa	101
B) Amilopectina	101
2.- Estructura granular	102
3.- Propiedades principales	103
A) Gelatinización	103
B) Cambios de viscosidad	104
C) Formación de gel	105
D) Retrogradación	105
E) Formación de película	106
F) Efectos de otros ingredientes alimenticios	106
1.- Azúcar	106
2.- pH	107
3.- Sales	108

	Pág.
4.- Grasas y agentes de superficie	108
5.- Proteínas	109
6.- Leche	109
4.- Métodos analíticos	109
A) Extracción selectiva	111
B) Hidrólisis selectiva	112
4.- Nitritos	114
1.- Antecedentes	114
2.- Química del curado	114
3.- Efectos antimicrobianos	116
4.- Efectos sobre el sabor	118
5.- Toxicidad de los nitritos	119
6.- Métodos analíticos	124
IV.2.- MATERIAL Y METODOS	128
1.- Determinación de glucono- δ -lactona	128
1.- Extracción	128
2.- Cromatografía en capa fina	128
2.- Determinación de las proteínas de soja	129
1.- Preparación de la muestra	129
A) Extracción de los lípidos	130
B) Extracción proteica	130
2.- Electroforesis	131
A) Preparación del gel de acrilamida 7,5%	131
B) Desarrollo electroforético	132
C) Tinción y fijación de las bandas	133
3.- Determinación del almidón	134

	Pág.
1.- Método cualitativo	135
2.- Método cuantitativo	135
A) Extracción de azúcar y de grasa	135
B) Extracción del almidón	136
C) Determinación de glucosa	136
1.- Método de Glover y col. (1966)	136
1.- Determinación del almidón	137
2.- Método de Dubois y col. (1956)	137
4.- Determinación de nitritos	140
1.- Reactivos	140
A) Soluciones utilizadas para la precipitación de proteínas	140
B) Reactivo colorimétrico	140
2.- Precipitación de las proteínas	141
3.- Determinación colorimétrica	141
4.- Cálculo	142
IV.3.- RESULTADOS Y DISCUSION	144
1.- Glucono- δ -lactona	144
1.- Determinación de glucono- δ -lactona	144
2.- Prueba de degustación	154
2.- Proteínas de soja	163
1.- Detección de proteínas de soja	163
3.- Almidón	178
1.- Detección de almidón	178
2.- Niveles de almidón	178
4.- Nitritos	185

	Pág.
1.- Niveles de nitritos	185
CAPITULO V.- CONCLUSIONES	193
BIBLIOGRAFIA	197

CAPITULO I

INTRODUCCION GENERAL.

CAPITULO I.

INTRODUCCION GENERAL.

Desde que Liebig en 1840, con la introducción de los fertilizantes minerales en Agricultura, permitió mejorar y multiplicar la producción mundial de alimentos, a la actualidad en que son más de 15.000 las sustancias de origen químico empleadas en los alimentos, ha sido enorme el avance alcanzado tanto en la producción y síntesis de estos productos, como en el conocimiento de sus propiedades, toxicología, mecanismo de acción y sistemas de control. Sin embargo, todavía son muchas las lagunas de nuestro conocimiento en este campo, que exigen continuar y profundizar los estudios realizados para resolver una problemática tan amplia como atractiva y cuyo interés es enorme como lo demuestran, no sólo las instituciones españolas (Servicios de Sanidad, - de Control de Fraudes, etc.) e internacionales (Codex Alimentarius Mundi, O.M.S., F.A.O., etc.) preocupados por este campo, sino la existencia de revistas que como International Flavours and Food Additives, - Toxicology, Deutsche Lebensmittel-Rundschau, Federal Register, Stärke, etc., están dedicadas en gran parte, cuando no exclusivamente, a los aditivos y residuos químicos y medicamentosos que de una u otra forma a través de los alimentos van a ejercer su efecto en el hombre.

Recordemos a este respecto que ya en 1961, Truhaut señaló que las sustancias químicas exógenas podían llegar a la cadena alimenticia del hombre por algunas de estas vías:

a) Como consecuencia de tratamientos administrados a los animales antes de su sacrificio.

b) En el caso particular de los alimentos vegetales, por luchar contra determinadas plagas con insecticidas, fungicidas, herbicidas, ro-

denticidas, etc., muchos de cuyos productos son estables frente a los agentes físicos, químicos y biológicos ambientales, lo que les permite persistir en algunos alimentos durante mucho tiempo, si no se toman las debidas precauciones.

c) Como consecuencia de fallos o defectos durante la preparación, - conservación y distribución de los alimentos.

d) Debido a su adición voluntaria para prolongar su conservación - (antisépticos, antioxidantes, conservadores diversos, etc.) o para mejorar su aspecto, aumentando la atracción ejercida en los posibles consumidores (aromatizantes, edulcorantes, emulsificantes, colorantes, - etc.).

La posible presencia de estas sustancias en los animales productores de alimentos, bien por una administración intencional o puramente accidental, ha ampliado el campo de la Higiene de los Alimentos que, de acuerdo con la O.M.S. tiene como misión mejorar el bienestar y capacidad creadora del hombre; por ello puede afirmarse con Labie (1970) que el control higiénico alimentario exige una vigilancia adecuada de todas las fases que van desde las condiciones de cría y explotación - animal, hasta el momento de consumir los alimentos para poder así garantizar que no contienen sustancia alguna capaz de atentar contra la salud de los consumidores.

Por lo que se refiere a las sustancias que se estudian en esta tesis, suelen adoptarse dos posturas que, aunque respetables, son totalmente contradictorias: De una parte están quienes dramatizan el posible peligro potencial existente en los alimentos que contengan residuos de las mismas y sobre todo, en el caso de la carne, dietilestilbestrol (DES) y antitiroideos. De otra no faltan quienes, de acuerdo

con los resultados alcanzados por las modernas técnicas de producción animal, defienden su empleo rutinario en zootecnia.

Unos y otros aducen argumentos en pro de sus puntos de vista y aunque la polémica sobre el empleo de tales sustancias se inició a fi nes de la década de los años cincuenta, todavía persiste, si bien afor tunadamente con menos calor y más argumentos científicos. El problema reside realmente, como señala Bellani (1970), en saber si en los ali mentos de origen animal persisten residuos de aditivos y además en dis poner de métodos capaces de detectarlos.

En el presente trabajo nos impusimos como tarea: a) estudiar la presencia de estrógenos de síntesis y antitiroideos en la carne del ga nado vacuno que corrientemente surte los mataderos españoles y b) po ner de manifiesto en embutidos típicos españoles la posible existencia de los aditivos más frecuentemente utilizados en el extranjero en pro ductos similares; concretamente nos hemos limitado a nitritos, gluco no- δ -lactona, proteína de soja y almidón, que son las cuatro substan cias que con mayor frecuencia emplea la industria cárnica extranjera - en la elaboración de embutidos, en unos casos para conservar el alimen to sometiénolo a tratamientos menos drásticos y en otros con fines - sencillamente fraudulentos.

Nuestra dedicación a este estudio ha sido consecuencia de nues tro deseo de contribuir a un mejor conocimiento de un problema que ha pasado ya de los límites de laboratorios y revistas científicas espe cializadas, al dominio público, merced en gran parte a la orientación sensacionalista de muchos periódicos, revistas y ciertos espacios de otros medios de comunicación social. Creemos que la mejor forma de lu char contra el fraude, cuando existe, y contra la ignorancia o al te-

mor ante situaciones que no se entienden, es el análisis del problema y la búsqueda de soluciones reales al mismo.

Teniendo en cuenta cuanto antecede hemos estudiado, en primer lugar, el empleo de antitiroideos y estrógenos de síntesis en la producción de carne vacuna, poniendo a punto métodos químicos de detección de los mismos que si bien se han utilizado en otros países, en España, hasta donde llega nuestra información, no se han puesto en práctica en ningún momento a pesar de que su empleo en alimentación animal está prohibido tanto en el caso de los estrógenos (Boletín Oficial del Estado del 7 de julio de 1977), como en el de los antitiroideos (Boletín Oficial del Estado del 12 de marzo de 1977). Algo semejante se ha realizado con los cuatro aditivos antes mencionados.

En todos los casos se ha intentado, no sólo la puesta a punto del método que creemos más útil para un análisis rutinario, sino que también se ha hecho un estudio crítico experimental de otros métodos - afines que, sin embargo serían de escasa utilidad en los mataderos y fábricas de productos cárnicos españoles, dada la especial estructura de los laboratorios de aquellos escasos ejemplos en que la industria española dispone de tan valiosos colaboradores.

Por todo ello hemos agrupado en cinco capítulos independientes cada uno de los aspectos que esta tesis contempla, aunque ajustándose cada uno de ellos a la misma estructuración. Comenzamos señalando cuáles han sido los métodos, reactivos y productos de carácter general - utilizados en la parte experimental para hacer, después en otros capítulos una revisión bibliográfica, en absoluto exhaustiva, de los conocimientos actuales sobre el tema, pero limitados exclusivamente a los aspectos que directa o indirectamente inciden en el problema que nos

interesa, una descripción de la parte experimental específica (material y métodos) que hemos utilizado y después de exponer y discutir - los resultados obtenidos, al final del trabajo se presentan, esta vez conjuntamente, las conclusiones alcanzadas.

CAPITULO II

MATERIAL, PRODUCTOS Y METODOS GENERALES.

CAPITULO II.

MATERIAL, PRODUCTOS Y METODOS GENERALES.

II.1. MATERIAL.

II.1.1. Material general.

Las disoluciones acuosas se prepararon con agua desionizada, en un desmineralizador "Seta"⁽¹⁾ modelo R600, o con destilada en un aparato "Vitrolab", 84/h.

Las pesadas de precisión se efectuaron en balanzas analíticas "Sartorius" modelo 2443 y "Microwa" modelo 6620. Para las pesadas ordinarias se emplearon granatorios "Ohaus" de triple brazo y balanzas mono plato "Sauter" modelo S.1000.

Para las estimaciones del pH se utilizó un pHmetro "Beckman", modelo Expandomatic SS-2.

Los tratamientos térmicos se realizaron en estufa de desecación y esterilización por aire forzado "Heraeus", modelo KTFU-K, en autoclave "Gruber & Kaja" modelo CVII/1000, en baño de glicerina provisto de un termostato "Braun", modelo Thermomix-LL ($\pm 0,05$), y en baños de agua "Salvis", modelo WB-44, "Kottermann" modelo 304T/228 y "Re totherm" modelo MU85II.

Para las centrifugaciones se emplearon centrifugas "Sorvall" modelo GLC-1 y "M.S.E." modelo Super-Minor.

Las determinaciones colorimétricas se realizaron en un colorímetro "Bauch & Lomb", modelo Spectronic-20, o en espectrofotómetro de doble haz "Beckman", modelo DBG7.

Las homogeneizaciones de las muestras tuvieron lugar en un triturador de cuchillas "M.S.E.", modelo 7700.

Para la observación de manchas fluorescentes se empleó una lámpara de rayos ultravioletas "Uvaton", a una longitud de onda de 366 nanómetros.

Las bandas electroforéticas se leyeron en un densitómetro - óptico "Joyce Loebel", modelo Chromoscan 1967.

Para la conservación de las muestras se utilizaron arcones - de congelación "Kelvinator" modelo AC-550, frigoríficos "Philips" y "Aspes" y cámaras frigoríficas construidas para tal fin por un proveedor local.

II.1.2. Concentraciones de volumen.

Las concentraciones de grandes volúmenes de disolventes orgánicos se efectuaron en un rotovapor "Buchi", modelo EL, equipado con un dispositivo de elevación y acoplado a un baño maría. Los volúmenes pequeños de disolventes orgánicos (menos de 25 ml.), se eliminaron total o parcialmente mediante corriente de nitrógeno, manteniendo las - muestras al baño maría a temperaturas comprendidas entre 30 y 40°C.

II.1.3. Cromatografías y electroforesis.

Las cromatografías se llevaron a cabo en columnas de vidrio "Afora" de diverso tamaño, provistas de placa filtrante y llave de teflón y en placas de vidrio (20x20 cm.) que se recubrían con el soporte correspondiente, mediante un aparato "Quickfit", utilizando para su desarrollo cubetas de la misma marca.

Las electroforesis de disco se practicaron en un aparato "Carnalco", modelo 1200, equipado con una fuente de alimentación eléctrica de la misma firma que permitía regular la intensidad de la corriente - entre 1 y 60 mA.

II.2. PRODUCTOS.

II.2.1. Reactivos y patrones.

Todos los productos químicos utilizados en las diversas experiencias que se citan en esta tesis fueron de calidad reactivo, suministrados por "Merck", "Fluka", "Sigma", "Serva" o "Probus".

Las sustancias empleadas como patrones tenían un grado de pureza, superior al 98%, y procedían de las firmas "Merck", "Sigma" y "Fluka".

II.2.2. Soportes cromatográficos y electroforéticos.

Los soportes cromatográficos de las columnas y placas cromatográficas fueron suministrados por "Merck"; "Macherey, Nagel & Co." y "Fluka".

La sílica gel, antes de su uso, se liberó del material orgánico que contenía siguiendo la técnica descrita por Hardy y Mackie - (1969), para lo cual, se empaquetó una cantidad apropiada en una columna cromatográfica y se percoló con una mezcla de cloroformo/metanol - (2/1) (v/v) hasta que el eluyente obtenido se hacía incoloro. Los restos de cloroformo/metanol se eliminaron con benceno y éste, a su vez, filtrando a vacío en embudo Büchner y con calentamiento posterior a 110°C en una estufa de desecación durante 24 horas.

Las láminas para cromatografía en capa fina se prepararon con sílica gel G-60 ("Merck") o G-25H ("Macherey, Nagel & Co."). Para ello se mezclaron, en un erlenmeyer de 500 ml., 30 gramos de sílica gel con 40 ml. de agua destilada, al cabo de 10-20 segundos se añadieron 20 ml. de agua destilada; se formó así una pasta que se agitó energicamente durante 75-90 segundos y se extendió rápidamente sobre las

placas de vidrio; el espesor de las capas utilizadas fué de 250 micras. Durante 5 minutos se mantuvieron al aire con el fin de evaporar parte del agua. Luego se introdujeron en una estufa a 110°C donde permanecieron durante un período de 30 minutos, una vez secas se guardaron, hasta su empleo, en un desecador sobre Cl_2Ca .

El óxido de aluminio, contenido en un erlenmeyer, se activaba antes de su empleo adicionándole 0,1 ml. de agua destilada por gramo y sometiéndolo a continuación a un calentamiento a baño maría a 70°C., - con agitación constante, durante 10 minutos.

Las resinas utilizadas (Dowex 50W-X8, "Fluka"), antes de su uso, se trataron sucesivamente con 4 volúmenes de ClH 4N, lavando a vacío con embudo Büchner, primero con abundante agua destilada y después con 4 volúmenes de NaOH 2N. Posteriormente y durante una hora se calentaron a 70°C. en 2 volúmenes de NaOH 2N y luego se lavaron sucesivamente con una cantidad apropiada de agua destilada, con 4 volúmenes de ClH 4N y, por último, con el agua destilada necesaria para alcanzar un pH próximo a la neutralidad.

Los soportes electroforéticos de naturaleza acrilamídica fueron suministrados por "Serva".

II.2.3. Disolventes y purificación de los mismos.

Los disolventes orgánicos utilizados para las extracciones y cromatografías (benceno "Probus", metanol "Panreac" y cloroformo "Panreac") fueron purificados en el laboratorio sometiéndolos a destilación fraccionada utilizando una columna de Vigreux.

El éter etílico "Panreac", se deshidrató con alambre de sodio, preparado por extrusión en una prensa y se liberó de peróxidos, siempre inmediatamente antes de su uso, por destilación sobre polvo de hie-

rró reducido.

El éter de petróleo se preparó por destilación fraccionada de éter de petróleo comercial, utilizando una columna de Vigreux. Sólo se recogió la fracción comprendida entre 40 y 60°C.

II.2.4. Gases.

Para eliminar los disolventes orgánicos se empleó nitrógeno - de calidad industrial suministrado por la Sociedad Española de Oxígeno.

II.3. MÉTODOS.

II.3.1. Procedencia y toma de muestras.

II.3.1.1. Muestras procedentes de los animales.

Las muestras utilizadas en este estudio procedían de animales de la especie bovina obtenidos por cruces industriales de razas autóctonas (Aveleña, Retinta, etc.) con razas selectas (Charolais y Pardo Alpina, principalmente). Las edades de los mismos estaban comprendidas entre los 12 y 14 meses. Los animales fueron sacrificados en un matadero frigorífico de la provincia de Madrid siguiendo el proceder habitual.

La glándula tiroides se extrajo de los animales una vez degollados y antes de eviscerarlos, para ello, se realizó la disección de la piel de la región cervical inferior y se separaron los músculos esternocéfálico y omohioideo, con lo que quedó al descubierto la glándula que se separó del resto del animal después de eliminar sus adherencias fibrosas.

La muestra de hígado estuvo constituida por el lóbulo caudal de Spigelio completo, el cual se obtuvo mediante un simple corte con bisturí.

Las muestras de carne se tomaron de la musculatura del cuello haciendo un corte en esta región y separando una cantidad que en ningún caso fué inferior a 500 gramos. Antes de analizar las muestras se liberaron de la grasa superficial y del tejido conectivo adyacente.

El transporte de las muestras al laboratorio se realizó en - frascos de vidrio de boca ancha, esterilizados previamente y cerrados - herméticamente. Los análisis se realizaron, cuando la técnica lo requiera, inmediatamente de llegados los frascos al laboratorio y siempre an - tas de transcurrir 24 horas del sacrificio.

En otros casos, se conservaron bajo congelación a una temperatura de -20°C . De igual forma se procedió con los extractos obtenidos a partir del material fresco. Para la conservación a corto plazo (no más de 24 horas) se utilizaron cámaras frigoríficas a 1°C . aproximadamente.

II.3.1.2. Muestras de productos cárnicos.

Los productos cárnicos que se emplearon en las experiencias que se describen en esta memoria estuvieron constituidos por una amplia gama de los mismos (chorizo, salchichón, salami, jamón tipo "York", mortadela y salchicha tipo "Frankfurt").

Estos productos se adquirieron en diferentes supermercados locales y procedían de diversas firmas comerciales nacionales y algunas muestras se obtuvieron a partir de productos extranjeros.

Las muestras se tomaron después de haber separado la envoltura que las recubría bien natural o artificial. En los casos de productos perecederos, tal como las salchichas tipo "Frankfurt" se conservaron, después de tomar la muestra, por congelación (-20°C) o refrigeración (1°C .) según las necesidades.

II.3.2. Metodología específica.

La metodología específica utilizada para realizar las experiencias que se estudian en este trabajo, se describirá en los capítulos correspondientes.

(1) La cita de las marcas comerciales, tanto del material, como de los reactivos, no significa que la autora las recomiende con preferencia - a otras del mercado.

CAPITULO III

SUSTANCIAS ANTITIROIDICAS Y ESTROGENOS DE SINTESIS.

CAPITULO III.

SUSTANCIAS ANTITIROIDICAS Y ESTROGENOS DE SINTESIS.

III.1. INTRODUCCION.

III.1.1. Sustancias antitiroideas.

Antes de hablar de las sustancias antitiroideas haremos una breve descripción del tiroides.

III.1.1.1. Recuerdo anatómico, histológico y fisiológico del tiroides.

El tiroides es una glándula de secreción interna muy vascularizada que se encuentra adherida a la parte anterior de la tráquea por un tejido conjuntivo laxo. Consta de dos lóbulos laterales (derecho e izquierdo), situados a cada lado de la tráquea, y una porción media, - istmo, situado sobre la cara ventral de aquélla y que une a los lóbulos por sus polos caudales (Schwarze y Schröder, 1972).

La forma, tamaño, color, textura y peso varía en las distintas especies animales.

En la especie bovina cada lóbulo es triangular y aplanado, - presenta una superficie irregular, un color que varía de marrón rojizo a color carne típico y su textura que es más blanda que la del caballo. El istmo tiene forma de cinta, es constante y glandular, y su anchura es de 0,5 a 1 cm. (Sisson y Grossman, 1975).

Cada lóbulo tiene una longitud de 5 cm., una anchura de 4 cm. y un grosor de 1 a 5 cm. (Sáenz Egaña, 1967). El peso absoluto alcanza en el toro unos 21-36 gramos.

La glándula tiroides está envuelta por una cápsula de tejido conjuntivo, de la cual parten vainas hacia el interior del órgano, en

forma de red que lo dividen en lobulillos irregulares cuyo parénquima consta de vesículas de distintos tamaños y completamente cerradas, denominadas "folículos tiroideos", los cuales están revestidos por un epitelio de una sola capa y contienen el coloide tiroideo en donde está el principio activo de la glándula.

El riego sanguíneo corre a cargo de las arterias y venas tiroideas, que al igual que los linfáticos, están sumamente desarrolladas. Su inervación procede del simpático, cuyos filetes serían vasoconstrictores y secretores, existiendo también fibras parasimpáticas representadas por los nervios laríngeos superior e inferior.

En cuanto a su fisiologismo podemos decir que las células del epitelio glandular incorporan yoduros de la sangre y los oxidan a yodo, que emplean para yodar la tirosina convirtiéndola en mono- y diyodo- tirosina, que posteriormente se utilizan para la síntesis de triyodotironina y tiroxina. La triyodotironina es de 3 a 5 veces más activa que la tiroxina.

La tiroxina ejerce una influencia manifiesta sobre el metabolismo; el sistema nervioso; el crecimiento, especialmente del tejido óseo así como en el desarrollo corporal del organismo y la vitalidad del animal.

La regulación de la síntesis y secreción de la tiroxina en el tiroides se lleva a cabo por medio de la hormona tireotropa del lóbulo anterior de la hipófisis, cuya secreción aumenta al disminuir el nivel sanguíneo de tiroxina. La producción de tirotrópica está influida por centros reguladores del metabolismo situados en el hipotálamo. Todos los factores que hacen necesaria una activación del metabolismo, como por ejemplo el frío y el trabajo muscular intenso, aumentan la activi-

dad del tiroides (Kolb, 1971).

III.1.1.2. Definición y clasificación.

Las sustancias antitiroideas son las que impiden la acción de las hormonas tiroideas, interfiriendo en la síntesis o liberación de - las mismas (Grollman y Grollman, 1970). Comprenden tres grupos de sustancias: los agentes bociógenos, los yoduros y el yodo radioactivo.

Los agentes bociógenos según Sollmann (1957) son los que bloquean la síntesis de las hormonas tiroideas por lo que se les considera los "agentes antitiroideos propiamente dichos". Este bloqueo trae como consecuencia una caída del nivel de dichas hormonas en la sangre y un aumento de la secreción de tirotropina en el lóbulo anterior de la hipófisis lo que acarrea una hipertrofia e hiperplasia tiroidea.

Los yoduros impiden la liberación de hormonas tiroideas mientras que el yodo radioactivo destruye las células de las vesículas tiroideas.

Existen dos grupos de agentes bociógenos:

a) Los tiocianatos o sulfocianuros que bloquean la incorporación de yoduro por la glándula tiroides, pero que son muy poco activos y muy tóxicos.

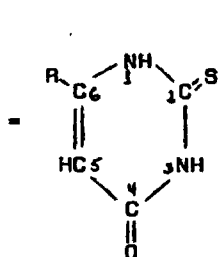
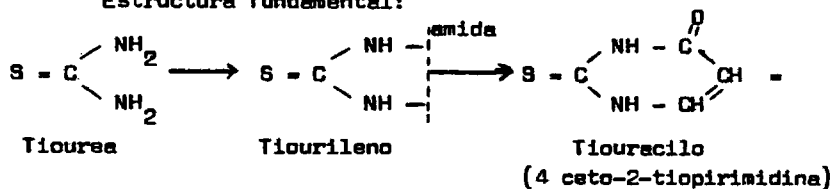
b) Las tionamidas o tioureas, que son los fármacos más importantes, los más utilizados y los que son objeto de nuestro estudio.

III.1.1.3. Las tionamidas o tioureas: Origen y química.

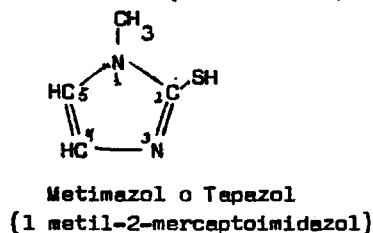
Los antitiroideos bociógenos son de origen sintético, su descubrimiento se debe a Kennedy (1942); son derivados de las tioureas, - también denominadas tiourilenos o tionamidas. El radical tiourileno, - que lleva las funciones amida, puede formar parte de un anillo hetero-

cíclico, la pirimidina, como en el tiouracilo y derivados, o del anillo heterocíclico imidazol, tal como sucede con el metimazol o tapazol.

Estructura fundamental:



(R=H, metil, n-propil o fenil).



III.1.1.4. Biosíntesis de las hormonas tiroideas, en relación con el mecanismo de acción de las tioureas.

La síntesis y liberación de las hormonas tiroideas se realiza por etapas (Keele y Neil, 1965; Ingbar y Woeber, 1968; Grollman y Grollman, 1970):

A) Incorporación de yoduro al tiroides ("trampa de yoduro").

El yodo ingerido con los alimentos llega a la sangre en forma de yoduro y muy pronto lo fija y concentra el tiroides. Esta incorporación es estimulada por la tirotrópina hipofisaria; en ausencia de esta hormona, como en casos de hipofisectomía (Morton y col., 1942) no tiene lugar, los tiocianatos bloquean también dicha incorporación.

B) Oxidación del yoduro y fijación a la tirosina.

Para que el yodo pueda fijarse a las sustancias orgánicas, es necesario que el ión yoduro, dentro del folículo tiroideo, se transforme en yodo libre.

De Robertis y Grasso (1946) demostraron mediante estudios histoquímicos que este proceso es una oxidación catalizada por un enzima - oxidante, la peroxidasa, oxidación que es inhibida por las tioureas.

Una vez formado yodo libre, se fija en el aminoácido tirosina (yodización), que se encuentra formando parte de la molécula de tiroglobulina en el folículo tiroideo, para formar monoyodotirosina (MIT), que después incorpora otro átomo de yodo, transformándose en diyodotirosina (DIT).

C) Formación de las hormonas tiroideas. Acoplamiento.

Por conjugación de una molécula de MIT y una de DIT se forma la triyodotironina (T_3) que se encuentra en pequeña cantidad en el folículo tiroideo, aunque tiene una actividad superior (4 veces) a la de la tiroxina (Fields, 1957).

La tetrayodotironina, T_4 o tiroxina, se forma por conjugación de dos moléculas de DIT con pérdida de alanina de una de ellas (figura 1).

En ambos casos interviene un enzima acoplador que es fácilmente bloqueado por las tioureas.

Las hormonas tiroideas así formadas se unen mediante enlaces peptídicos con las tiroglobulinas del coloide.

D) Liberación de las hormonas tiroideas.

Las hormonas tiroideas se liberan de la tiroglobulina bajo la

Figura 1.- Esquema de la síntesis de las hormonas tiroideas y puntos de bloqueo por las tioureas.

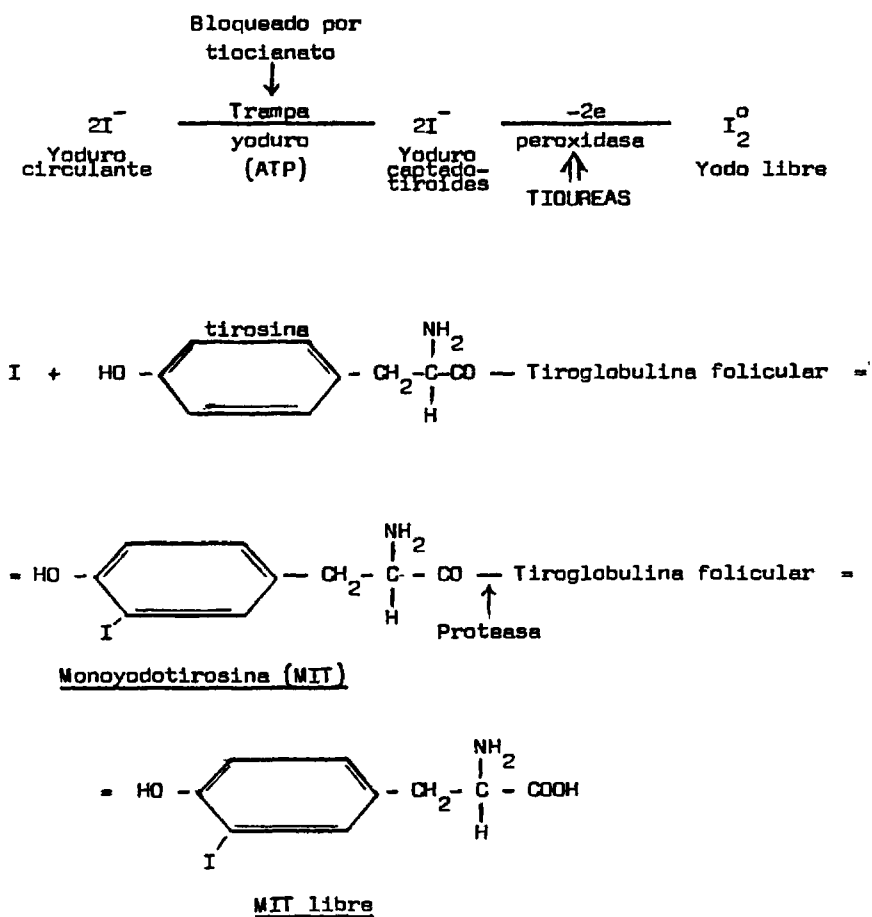
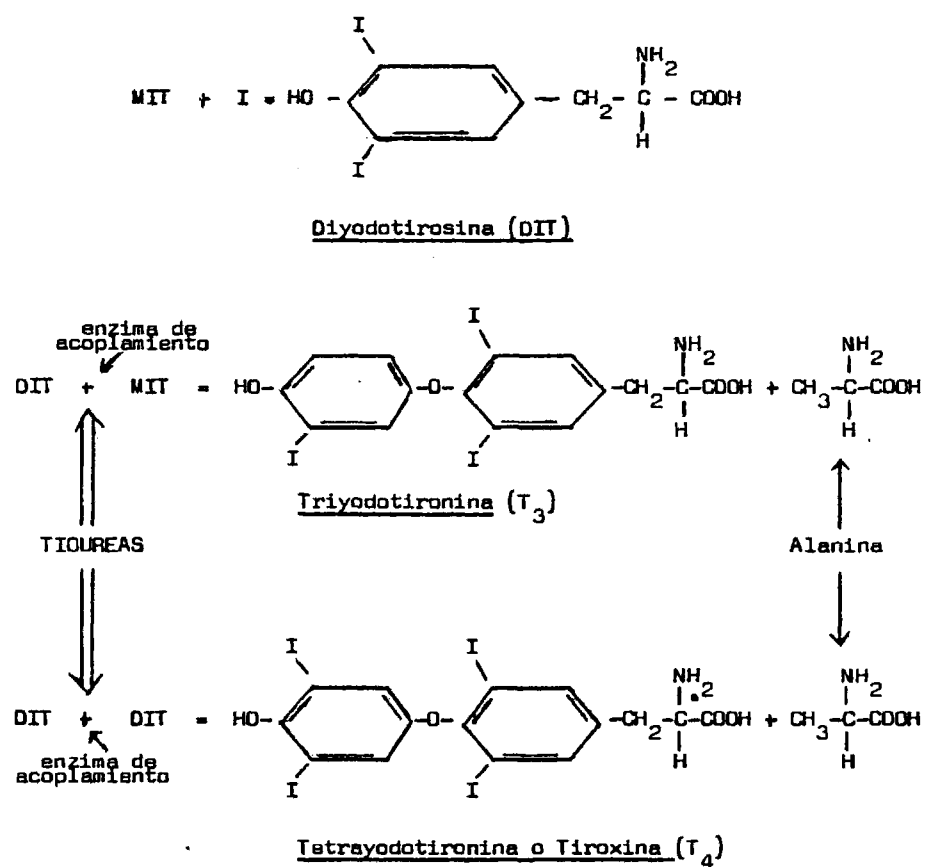


Figura 1.- Continuación.

acción de una proteasa tiroidea (De Robertis y Nowinski, 1946), pues unidas no pueden atravesar el epitelio folicular. Este enzima es inhibido por el yodo con lo que disminuye así la liberación de hormonas tiroideas, mientras que la tirotropina hipofisaria la favorece (Morton y col., 1942).

Una vez liberadas, las hormonas tiroideas llegan a la sangre atravesando el epitelio folicular y circulan combinadas con las proteínas plasmáticas, especialmente con una α -globulina.

III.1.1.5. Acción antitiroidea.

Como su nombre indica, la acción fundamental de estas sustancias se ejerce en la glándula tiroides.

A) Efectos bociógenos e hipotiroides.

La administración de las tioureas a los animales les provoca un aumento del tamaño y peso del tiroides, lo que constituye la "acción bociógena"; se produce hipertrofia e hiperplasia del epitelio y disminuye el coloide de los folículos.

El metabolismo basal desciende y se detiene el crecimiento y desarrollo de los animales, produciéndose así un cuadro de hipotiroidismo con todos sus síntomas: apatía; debilidad muscular; engrosamiento de la piel; caída del pelo; insuficiencia genital debida a hipofunción hipofisaria; retención hídrica en forma de edema duro subcutáneo que contiene agua, cloruro sódico y una mucoproteína que es la que retiene la sal y agua en el líquido intersticial; aumento de peso, debido especialmente al edema; anemia (por falta de absorción de vitamina B₁₂) e hipertrofia cardíaca.

Se acepta que las tioureas no bloquean la acción calorigénica

de las hormonas tiroideas en los tejidos, sino que deprimen la formación de las mismas por la glándula; la disminución de hormona tiroidea (tiroxina) en sangre es acusada por la hipófisis (mecanismo de feedback) que responde aumentando la producción de hormona tireotropa que, sin embargo, no va acompañada de una mayor síntesis de tiroxina sino de una hiperplasia tiroidea (mecanismo compensador) (Astwood, 1943)

B) Diferencias en la actividad de las tioureas.

Existen diferencias en la actividad antitiroidea o bociógena de las tioureas que son de carácter cuantitativo (Selenkow y Collaço, 1961), puesto que la potencia relativa de las mismas varía de acuerdo con la especie animal en que se utilice. Por ejemplo, se ha comprobado que los derivados del imidazol son más activos, menos tóxicos y de efectos algo más rápidos que los derivados del tiouracilo (Irwin y col., - 1952; Mc Gavack, 1953).

C) Mecanismo de acción.

Los agentes bociógenos derivados de la tiourea, como se ha indicado más atrás, interfieren la síntesis de las hormonas tiroideas, - bien impidiendo la conversión del yoduro en yodo libre por inhibición de la peroxidasa con lo que el último no puede incorporarse a la tirosina para formar MIT y OIT, o también evitando la conjugación de las moléculas de sus precursores con lo que no se forman las hormonas tiroideas.

III.1.1.6. Otras acciones de las tioureas.

Además de este efecto antitiroideo pueden producir otras acciones de carácter tóxico, tratándose generalmente de reacciones adversas por hipersensibilidad alérgica, consistentes principalmente en erup

ciones cutáneas y manifestaciones hemáticas, especialmente agranulocitosis (Ingbar y Woerber, 1968).

III.1.1.7. Absorción, destino y excreción.

Estos aspectos han sido estudiados por Sitar y Thornhill - (1972-73), empleando propiltiouracilo (PTU) y metimazol (TAP), marcados con carbono radioactivo.

Se ha observado que se absorben perfectamente por todas las vías normales de administración, incluida la gastrointestinal; al pasar a la circulación el PTU se combina con las proteínas plasmáticas en la proporción del 57% mientras que el TAP lo hace en un 5%.

Se distribuyen por todos los tejidos y líquidos del organismo, atraviesan la barrera placentaria y pueden llegar a la leche, de esta manera son capaces de inhibir la función tiroidea del feto y del lactante. Se metabolizan parcialmente en el organismo (40 a 50%), formando los glucurónidos correspondientes; dichos metabolitos y sus fármacos madre libres se excretan especialmente por la orina y una pequeña porción por la bilis.

Los procesos de biotransformación y excreción son rápidos de manera que es necesario suministrar el producto varias veces al día, al menos cada 8 horas.

III.1.1.8. Vía de administración.

La única vía de administración utilizada en la práctica con estas sustancias es la bucal.

III.1.1.9. Métodos analíticos.

Aunque la mayoría de los países europeos prohíben el uso de las sustancias antitiroideas en la alimentación del ganado, esta prác-

tica es todavía frecuente debido a la falta de un control eficaz de las mismas.

De ahí que hayan sido propuestos varios métodos para determinar su presencia en las canales antes de su distribución comercial. Uno de estos métodos consiste en el examen histológico de la glándula tiroides (Griem, 1975).

Para que el resultado de este examen sea significativamente fiable es imprescindible la fijación inmediata de las muestras de la glándula en formalina al 5-10%, ya que los cambios autolíticos post-mortem aparecen ya transcurrida una hora después del sacrificio.

Kreula y Kiesvaara (1959) demostraron la presencia del antitroideo 5-vinil-2-tioxazolidona en la leche. El residuo extraído de la leche con acetato de etilo fué cromatografiado bidimensionalmente sobre papel usando como solventes primero ácido acético al 0,5% y después una mezcla de metanol/éter etílico. La zona en que aparecía tioxazolidona en el cromatograma se eluyó y posteriormente se estimó espectrofotométricamente a 240 nm. Las recuperaciones fueron altas, con una medida límite de 0,1 p.p.m.

Bruggemann y Schole (1967) separaron los tiouracilos del pienso extrayendo con etanol caliente y luego los identificaron mediante cromatografía de papel eluyendo con n-butanol saturado con una solución acuosa de amonio 0,2N. Las manchas fueron visualizadas con 2,6 dicloroquinonimida. Los Rfs. fueron 0,02; 0,41 y 0,26 para el tiuracilo, metil-tiouracilo y propil-tiouracilo respectivamente.

Los análisis colorimétricos del metil-tiouracilo (MTU) en tiroides y carne constan de una purificación cromatográfica del extracto y luego de un desarrollo colorimétrico con el reactivo de Grote (Böhnel,

1966) o con una solución de 2,6 dicloroquinonimida (Van Waes, 1973).

El método de Van Waes (loc. cit.) está basado en una extracción con metanol y cromatografía en columna de óxido de aluminio con cloroformo:metanol (1:1) como eluyente. La determinación se hace mediante lectura a 435 nm. debido a la formación de un color amarillo con la 2,6 dicloroquinonimida. Las recuperaciones del tiouracilo añadido a 0,1 p.p.m. eran altas si se realizaban los análisis sin demora.

Como las sustancias interfirientes eran un problema en los métodos anteriores; Gissel y Schaal, (1974) propusieron un método similar para la extracción de los tejidos glandulares pero, para la cromatografía utilizaron placas finas de sílica gel G-60 que desarrollaron con tricloroetano:etanol (8:2) y revelaron con 2,6 dicloroquinonimida. Al someter dichas placas a la luz ultravioleta a 254 nm. detectaron tres tiouracilos. La detección límite en tejidos fué de 0,5-1,0 p.p.m.

Mediante técnicas que implican la formación de derivados fluorescentes con los compuestos que tienen un grupo funcional propio, que completaban a su vez con cromatografía en capa fina, Brabander y Verbeke (1975) detectaron diversos antitiroideos, como fenil-tiouracilo (FTU); MTU, PTU y TAP, hasta concentraciones de 1 parte por 100 millones. Las muestras de tejidos se extrajeron con metanol y el extracto acidificado se desengrasó con éter de petróleo. La purificación del extracto se realizó con una resina intercambiadora de aniones (Dowex 50W-X8). Después de eluido con 5 ml. de metanol al 75%, el extracto se concentró, tamponizó y desengrasó con éter etílico. La muestra se hizo reaccionar con una solución acetónica de NBD-Cl (7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3 diazol) a 40°C. Aliquotas de los derivados obtenidos se cromatografiaron en capas finas de sílica gel y se desarrollaron bidimensionalmente, primero

con cloroformo:etanol (95:5) y luego con cloroformo:ácido propiónico - (95:5). La estimación fué indirecta por visualización de unas manchas fluorescentes amarillo verdosas que aparecían después de su activación con una solución alcalina de cisteína.

Las recuperaciones de los "standards" fueron del 80% a niveles de 1 parte por 100 millones, pero con 2 gramos de muestras de carne las recuperaciones fueron mucho más bajas, aunque todavía mesurables.

Wildanger (1975) también llevó a cabo análisis de muestras, como Brabander y Verbeke, pero usó la cromatografía líquida de alta presión como técnica estimativa. Los tejidos fueron extraídos con metanol:agua (1:1) y el residuo se evaporó y se recogió en diclorometano.- El extracto así obtenido se sometió a cromatografía líquida de alta presión en una columna (300x3 mm.) de sílica gel "Merck-osorb SI-60", eluida con diclorometano:etanol:agua (712:18:12) y la detección se llevó a cabo a 280 nm. Este método permitió estimar concentraciones de hasta 0,5 partes por 100 millones de tiouracilos en carne y detectar hasta un nivel de 0,1-0,2 p.p.m.

III.1.2. Estrógenos de síntesis.

La síntesis del dietilestilbestrol (DES) en 1938 por Odde et al., constituyó el fundamento básico del empleo industrial de los compuestos hormonales para la producción y cría de animales sarcopoyéticos. Por primera vez se disponía con fines experimentales de un producto hormonal relativamente barato y extraordinariamente potente (Unger, 1975). Lorenz (1943) fue quien primero sugirió la posibilidad de emplear el DES en el engorde de pollos, mediante la implantación -

cervical de tabletas de esta sustancia.

Muy pronto se comprobó que administrado por vía parenteral el DES no sólo mejoraba la eficiencia del pienso, lo que se reflejaba en una mayor ganancia ponderal y tendencia al engrasamiento, sino que además tanto en hembras como en machos castrados bovinos y uvinos daba lugar también a modificaciones en el comportamiento sexual, estimulación mamaria, etc. (Andrews et al., 1949; Perry y col., 1951; Andrews y Beeson, 1953; Means y col., 1953).

Sin embargo, administrado per os con el pienso de los bóvidos persistían los efectos beneficiosos, sin que se manifestasen efectos - perjudiciales colaterales (Burroughs y col., 1954)

Además del DES se han utilizado otros derivados del estilbeno tales como hexestrol, dienestrol y sus dimetil derivados.

El DES se sintetiza bajo dos formas isoméricas: cis y trans; al comparar estos dos isómeros se observó que solamente el compuesto o forma trans mejoraba la ganancia de peso y el balance de nitrógeno en los bovinos y ovinos (Raun et al., 1970; Preston y col., 1971).

III.1.2.1. Actividad fisiológica y mecanismo de acción.

Los estrógenos ejercen múltiples acciones tanto en el tracto genital como en la glándula mamaria y aún en la secreción de gonadotropinas y en el metabolismo del Ca y Na principalmente.

La acción de los estrógenos, depende de muchas variables tales como especie animal, sexo, dosis y vía de administración, duración del tratamiento, etc., etc. (Preston, 1975).

Su acción sobre los órganos sexuales es característica: sobre el ovario ejercen una actividad directamente independiente de la in-

fluencia gonadotrópica que se traduce en la aparición de una intensa hiperemia ovárica; sobre el útero (trompa y cuerpo uterino) el efecto estrogénico provoca un intenso crecimiento muscular y mucoso que da lugar a un fuerte incremento del peso del útero; los estrógenos incrementan también el pH del moco cervical.

A nivel vaginal modifican la capa mucoso-epitelial, incrementando la mitosis de las células de la capa basal y conduciendo en definitiva a un aumento del espesor y proliferación celular (hiperqueratinización).

Sus acciones sobre el útero y sobre la vagina constituyen la base de los tests biológicos para la puesta en evidencia de sustancias de acción estrogénica en los productos biológicos. El test de Allen y Doisy o test del frotis vaginal (1923) que se efectúa con ratones o ratas ovariectomizados, se ha practicado mucho, lo mismo que el de Astwood o test del útero (1938) que tiene gran sensibilidad.

Las opiniones acerca del papel que los estrógenos juegan sobre el crecimiento y desarrollo del tejido mamario, son bastante discordantes, lo que posiblemente se debe a la variabilidad de respuestas de las distintas especies animales. Así provocan, en general, un crecimiento primario de los conductos en los roedores y un aumento del desarrollo del sistema lóbulo alveolar en los cobayas y primates cuando actúan concomitantemente con la progesterona. En los primates y en el hombre, los estrógenos son capaces per se de provocar un amplio y completo desarrollo glandular mamario (Cowie y Folley, 1961; Grollman y Grollman, 1970).

A nivel hipofisario, los estrógenos tienen la propiedad de inhibir la secreción de la hormona foliculoestimulante y estimular la de

la hormona luteinizante. En dosis elevadas y continuas, los estrógenos pueden llevar a la inhibición de todas las gonadotropinas hipofisarias; en consecuencia, se produce la anovulación y luego la atrofia del ovario- y del testículo en el sexo masculino-. La acción de los estrógenos sobre la secreción de gonadotropinas se realiza especialmente por intermedio del hipotálamo, lugar donde aquellos actúan; de esta forma, los estrógenos inhiben los centros hipotalámicos que normalmente producen los factores que liberan las gonadotropinas (GRF).

Sobre la glándula tiroidea se sabe que la administración de estrógenos en el hombre aumenta el nivel plasmático del yodo unido a las proteínas, sin que existan cambios significativos en la captación del yodo radioactivo.

Los estrógenos generalmente no ejercen efecto alguno a nivel suprarrenal en el hombre; sin embargo, en el animal puede existir una interesante relación entre el nivel estrogénico y el tamaño de las glándulas suprarrenales en el sentido de un aumento e hipertrofia de las mismas (Parkes, 1945).

Cuando son altos los niveles plasmáticos de colesterol y fosfolípidos y se administran estrógenos, aquéllos disminuyen significativamente.

Igualmente y debido a su efecto vasodilatador, aumentan extraordinariamente el flujo sanguíneo.

A nivel óseo, los estrógenos estimulan el desarrollo de la matriz protéica del hueso, favoreciendo la deposición cálcica. Los estrógenos promueven también un alto grado de retención sódica, con el correspondiente arrastre hídrico y aparición de edemas cuando se administran en dosis elevadas.

Bajo los auspicios de FAO/WHO se celebró en 1975 un simposio en Roma en el que se recogen con amplitud muchos de los datos aquí expuestos. Las ponencias y comunicaciones de este simposio han sido editadas por Lu y Rendel (1976).

Para explicar el mecanismo en virtud del cual los estrógenos y otras hormonas favorecen el crecimiento y cebo de los animales, se han hecho muchos experimentos - a veces con resultados contradictorios - que se han recogido, entre otras, en las revisiones de Lorenz (1954), Trankle (1969), Nalbandov (1969) y en el simposio de FAO/WHO ya citado.

En los broilers el efecto más saliente es el aumento de los lípidos plasmáticos y la deposición visceral y subcutánea de grasa; posiblemente como señala Umberger (1975), el rápido aumento de peso corporal se deba a la deposición de grasa. En las aves, los estrógenos no ejercen efecto anabólico alguno en el metabolismo del nitrógeno.

Los mamíferos por el contrario, no responden aumentando la deposición de grasa y en ciertos casos, contrariamente a lo afirmado, no hay aumento de la ganancia ponderal. El ritmo de crecimiento de ratas, ratones y cobayas se deprime a medida que aumenta la dosis de DES. Al parecer sólo los rumiantes responden aumentando la ganancia de peso vivo y mejorando la conversión del pienso. De acuerdo con Umberger (loc. cit.), existen ciertos datos que parecen indicar que tal respuesta es consecuencia del aumento de la secreción de hormona de crecimiento o de la insulina.

III.1.2.2. Destino metabólico.

Desde que comenzó el empleo del DES en producción animal, han sido muchos los investigadores preocupados por el destino metabólico de

los estrógenos de síntesis.

Recientemente Aschbacher (1976), ha publicado una interesante revisión sobre el metabolismo del DES en los rumiantes, cerdos y aves, cuando se administra por vía oral o por implante.

Mitchell y col., (1959) fueron los primeros en usar DES marcado con tritio [$(^3\text{H})\text{DES}$], para estudiar sus rutas metabólicas en los rumiantes. Estos estudios fueron posteriormente ampliados por Hinds et al. (1965) y sus resultados coincidieron con los anteriores en la baja recuperación de la radioactividad administrada (aproximadamente un 50%).

El DES marcado con ^{14}C , [$(^{14}\text{C})\text{DES}$], lo han empleado en varios estudios metabólicos de rumiantes, entre otros Aschbacher (1972); Aschbacher y Thacker, (1974); Rumsey et al. (1975), etc. Los animales a los que se suministraron un total de 100 mg. de DES fueron sacrificados a diversos intervalos y la orina y las heces fueron recogidas y analizadas, desde que se inició el tratamiento hasta el sacrificio. La concentración máxima de ^{14}C en el plasma sanguíneo se produce generalmente entre las 8 y 24 horas después de suministrar una dosis oral única de ($^{14}\text{C})\text{DES}$. Posteriormente dicha concentración declina rápidamente y la vuelta a la normalidad se realiza al cabo de 96 horas después de administrado el ($^{14}\text{C})\text{DES}$.

En ninguno de estos experimentos se detectó $^{14}\text{CO}_2$ en el aire expirado, siendo la orina y las heces las rutas de eliminación del ^{14}C más significativas.

Por las heces se excreta dos a tres veces más que por la orina. Aproximadamente el 85% de la radioactividad de la orina está representada por el monoglucurónido de DES.

La secreción biliar no ha sido cuantificada en los rumiantes;

sin embargo, las concentraciones relativamente altas de radioactividad de la bilis después de suministrada una dosis oral de (^{14}C)DES sugieren que la bilis es una vía secretora.

Los estudios de Huber y col., (1972) demostraron que el hígado conjuga eficazmente el DES para formar el correspondiente monoglucurónido (DES-G).

El hígado y el riñón son los únicos tejidos en los que se ha identificado el DES (o DES-G) después de su administración per os.

Los resultados obtenidos de los estudios de Aschbacher y Thacker (1974) y Rumsey y col. (1975), sugieren que el (^{14}C)DES residual en el hígado decrece rápidamente.

Después de la implantación subcutánea de (^{14}C)DES, la excreción fecal y urinaria declina progresivamente y se estabiliza a las 16-18 semanas de la implantación.

Las concentraciones de ^{14}C en los tejidos son siempre muy bajas comparadas con la cantidad total implantada. Las concentraciones de ^{14}C en la bilis son 30-60 veces mayores que en el plasma sanguíneo, y las de las glándulas salivares, pulmones, hígado y riñones de 2-10 veces más que en el plasma. Es interesante señalar que en el músculo, grasa, bazo y corazón, la concentración de ^{14}C es menor que en el plasma. La concentración relativamente alta de las glándulas salivares aparentemente no es indicativa de secreción salivar, dado que no se encontró ^{14}C en el rúmen (Aschbacher, 1976). Un año antes Ferrando y col. (1975) no encontraron DES en la saliva de ovejas a las que se les había implantado este estrógeno.

Del examen de los datos experimentales más recientes se deduce que la implantación de DES, en las condiciones normales de explota-

ción animal, da lugar siempre en un plazo de tiempo breve a contenidos residuales bastante bajos que desaparecen pronto.

Después de su administración parenteral a los bovinos, la concentración de DES en la carne disminuye aún más rápidamente.

III.1.2.3. Toxicología.

En general la toxicidad aguda de los estrógenos de síntesis es relativamente escasa. Trás la administración de grandes dosis de estas sustancias, las manifestaciones tóxicas observadas son las que cabe esperar de una sobredosificación hormonal; se caracterizan principalmente por alteraciones gastroentéricas.

Más importancia que la intoxicación aguda, tiene el efecto - cancerígeno que, según muchos investigadores acarrea el suministro continuado a las mujeres de pequeñas dosis de hormonas estrogénicas (Umberger, 1975).

La primera evidencia de que los estrógenos eran carcinogénicos data de 1930; según señala Burrows y Horning (1952) en su excelente publicación, al observar que en ratones hembras se originaba cáncer de mama, después de suministrarles durante varios meses por vía subcutánea un extracto de líquido folicular de los ovarios de cerdas. Más tarde se vió que el estrógeno de este líquido era el 17β estradiol. Pocos años - después se comprobó que en las estirpes de ratones sensibles podía originarse cáncer por inyección o implantación subcutánea de estrona, - 17β estradiol, equilina, equilenina y estrógenos de síntesis, como el DES. En 1941 se comprobó que este último compuesto originaba cáncer en los ratones cuando se administraba por vía oral.

Mühlbock y Boot (1958), suministraron a los ratones estrona de manera continuada con el agua de bebida a una concentración de -

100 µg/100 ml., comprobando que la respuesta carcinogénica al estrógeno sigue la curva de dosis/respuesta (Huseby, 1958; Mühlbock, 1960 y Gass y col., 1964). En todos los experimentos realizados por los investigadores citados la dosis mínima que daba lugar a respuesta carcinogénica era siempre superior a la necesaria para alcanzar la máxima respuesta estrogénica en la estirpe animal en que se experimentaba.

En 1971 fue publicado por Herbst y col. un estudio que asocia el desarrollo de adenocarcinoma de las células claras de la vagina humana con la absorción maternal de DES. Este ha sido y es el punto de partida de una larga polémica que continúa aún en nuestros días.

En 1976, Herbst también publicó un resumen sobre los cambios observados en el tracto genital de la mujer después de un tratamiento con DES.

Se han observado casos clínicos de adenocarcinoma vaginal en E.E.U.U., Canadá, México, Europa y Australia. Dos tercios de los casos están directamente asociados a la utilización de DES, dienestrol o hexestrol, mientras que el resto de los casos no puede ser explicado.

Recientemente, varios investigadores han señalado además un aumento de la frecuencia de cáncer de endometrio en las mujeres tratadas con DES y, curiosamente, con estrona después de la menopausia (Marx, 1976). Estas informaciones están siendo verificadas pero necesariamente tendrá que pasar un periodo largo de tiempo antes de ser confirmadas.

Los datos sobre los efectos del DES en los animales de experimentación son muy numerosos. Entre estos tenemos, además de los citados, los de Okey y Gass (1968) que son los más significativos. No obstante, es necesario señalar que también se han publicado numerosos trabajos que han dado resultados negativos.

Por otra parte, los experimentos realizados por Ferrando - (1972) parecen indicar ciertos efectos tóxicos del DES hasta entonces ignorados: De una parte, desórdenes graves en la reproducción de las ratas alimentadas con carne de animales tratados y de otra, una disminución del crecimiento, del peso medio de los testículos y del peso de los animales de esta misma especie.

Un profundo estudio de Metzler (1976), aporta otros elementos interesantes sobre el proceso de activación metabólica precancerígena del DES en los roedores y en el hombre. Entre los metabolitos urinarios y biliares que se han identificados en la rata y en el hamster, Metzler aisló por una parte dienestrol, y por otra derivados hidroxil- y metoxil- del dienestrol y del DES.

III.1.2.4. Métodos de análisis de estrógenos (naturales y sintéticos).

Los métodos para la detección de estrógenos pueden dividirse en histológicos, biológicos, químicos e inmunológicos. Cada uno de estos métodos tiene sus limitaciones y su aplicabilidad, lo que depende mucho del tipo de material a examinar.

En los mataderos, por ejemplo, se pueden examinar la carne, los órganos, el suero, la orina y las heces, mientras que en las granjas solamente pueden analizarse la orina, las heces y algunas veces el suero. A nivel residual, el examen se limita a la carne y a sus productos.

A) Métodos histológicos.

La administración de estrógenos puede detectarse por los cambios histológicos que se aprecian en los genitales y en sus glándulas accesorias. Estos cambios pueden variar en una misma especie y entre -

especies diferentes. Se han estudiado ampliamente en los terneros (Du-bois, 1965; Ruitenberg y col., 1967; Schaerschmidt, 1969; Kroes y col., 1970; Grunert y col., 1974), mientras que en corderos, cerdos y pollos la experiencia disponible es más limitada (Bennets, 1946; - Thorborg, 1948).

En los terneros la incidencia de una metaplasia mamelar en la próstata de los machos y en las glándulas de Bartolini de las hembras, se usa generalmente como prueba indicadora en la administración de es-trógenos.

El método histológico es muy sencillo ya que permite detectar la administración de estrógenos aún cuando estos hayan sido usados a ni-veles muy bajos.

B) Métodos biológicos.

El efecto estimulante del crecimiento que tienen los estróge-nos sobre las glándulas y la musculatura de los órganos genitales ha si-do usado para el desarrollo de varios métodos biológicos (Allen y Doisy, 1923; Astwood, 1938).

Los mejores resultados se han obtenido con roedores hembras (ratas y ratones) en las que los estrógenos inducen un incremento del - peso uterino y una cornificación vaginal. Ambos criterios han sido muy utilizados.

El material o muestra para analizar, como la carne del sitio de implantación o de inyección, el pienso, o el extracto de orina y he-ces se suministra como alimento a ratas y ratones infantiles. Si la - muestra poseía estrógenos, el peso del útero se incrementa más rápida-mente que el de los controles (Stob y col., 1954; Tiecco, 1961; Ruiten-berg y col., 1972). Este efecto se observó utilizando cantidades de

•

1-10 μg de DES o dienestrol y de 10-100 μg de hexestrol por Kg. de pienso. Para los estrógenos naturales el límite de este test, cuando se suministra oralmente, oscila entre 100-1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. de material original.

El test de la cornificación vaginal en roedores hembras castradas está basado en las observaciones de Allen y Doisy (1923). Este método permite unos límites de detección más bajos cuando el material extraído se administra por vía parenteral; dichos límites son de aproximadamente 2,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. de material original para el DES, dienestrol, estrona y 17 β estradiol; de 12,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. para el hexestrol y de 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. para el zeranol.

Ambos métodos ofrecen las mismas posibilidades de aplicación, pero el último es más específico para la detección de la actividad estrogénica ya que el incremento del peso uterino puede ser inducido por otros esteroides no estrogénicos como la testosterona y la trebolona.

La sensibilidad del test vaginal aumenta si se aplican intravaginalmente extractos concentrados del material a examinar (Emmens y Cox, 1960; Martin, 1960). Este método, sin embargo, consume mucho tiempo, y es técnicamente más difícil, por lo que su aplicabilidad es limitada. Lo mismo puede decirse de otros métodos biológicos que, sin embargo, son muy valiosos como métodos de referencia de la actividad biológica del compuesto, al igual que los histológicos.

C) Métodos químicos.

Desde el punto de vista del control, el método de detección química tiene la ventaja de ser corto, (un día), y de poder detectar específicamente la naturaleza del compuesto.

El análisis químico consta de varios pasos que dependen del

material al examinar. Por ejemplo, en la orina, hígado y riñones el compuesto buscado puede estar presente tanto en forma libre como en forma de glucurónido o sulfato, mientras que en el sitio de implantación o de inyección suele estar presente en forma de éster (acetato, benzoato, -propionato, etc.).

Todos los análisis químicos comienzan con una hidrólisis y una extracción del compuesto del material original. La hidrólisis puede ser ácida, alcalina o enzimática y puede hacerse antes o después de la extracción, dependiendo del material y del compuesto que van a ser examinados.

Posteriormente se necesitan varios pasos de lavado y concentración antes de realizar las distintas pruebas de screening y las pruebas químicas específicas.

En los países del Benelux y en los de la C.E.E. se han desarrollado métodos de extracción que permiten analizar los extractos después del lavado y concentración mediante los mismos procedimientos químicos preliminares y de detección. La prueba de screening se usa para diferenciar entre presencia de estrógenos sintéticos y de estrógenos naturales. Tales pruebas han sido propuestas, entre otros, por Waldschmidt (1972) y Schuller y Stephany (1973).

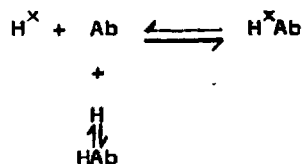
Los métodos específicos, especialmente para el DES, se basan generalmente en su cromatografía en capa fina y en la propiedad de transformarse en compuestos fluorescentes después de sometido a irradiación ultravioleta (Schuller, 1967), o a cromatografía gas-líquido (Smith y McNeil, 1972; Donoho y col., 1973; Kohrman y MacGee, 1977). Los métodos de cromatografía en capa fina son más sencillos y requieren menos tiempo que la cromatografía gas-líquido, pero sin embargo sólo son aná-

lisis semicuantitativos. Los límites de detección oscilan entre 1 a 10 $\mu\text{g/l.}$ o Kg. de material original.

D) Métodos inmunológicos.

En los últimos años ha aumentado el interés por el desarrollo de métodos de detección inmunológicos que se basan en la posibilidad de producir anticuerpos frente a los estrógenos tanto naturales como sintéticos. Los estrógenos per se no son inmunogénicos, pero cuando se unen a portadores proteicos sí que lo son y actúan como haptenos. Estos anticuerpos se obtienen mediante la inmunización de conejos u ovejas con las hormonas esteroideas o sintéticas acopladas a moléculas proteicas.

Cuando se tienen los anticuerpos se puede realizar un radioinmunoensayo (RIE), cuyo principio es el siguiente: una cantidad limitada del anticuerpo específico se hace reaccionar con una hormona marcada con un radio-isótopo (H^x). Cuando se añade hormona sin marcar (H), ésta se une al anticuerpo en una cantidad equivalente a la cantidad de hormona marcada liberada. Por lo tanto, se puede medir la cantidad de radioactividad de la H^x libre y la de la hormona radio-marcada unida al anticuerpo. El esquema sería el siguiente:



Los métodos de producción de anticuerpos específicos para esteroides han sido descritos por varios autores y revisados por Lieberman et al., (1959); Thorneycroft et al. (1970) y Abraham (1973).

Los radioinmunoensayos para esteroides estrogénicos han sido

descritos por Jiang y Ryan (1969); Abraham (1969); Exley y col., - (1971); Hoffmann y Karg (1973); Korenman y col., (1974) y Christner y Fatter, (1974). Los métodos para el DES fueron publicados por Abraham y col., (1972) y Rombauts (1973).

Se pueden presentar reacciones de interferencia entre grupos de compuestos relacionados estructuralmente, tales como la estrona, estriol y estradiol o DES, dienestrol y hexestrol.

El radio-inmunoensayo es generalmente muy sensible y permite detectar cantidades tan pequeñas como ng/Kg.

Bajo ciertas condiciones, y solamente si los niveles de estrógenos son muy altos, el radio-inmunoensayo puede ser usado con el suero o con otros fluidos biológicos sin necesidad de extracción. Sin embargo, en la mayoría de los casos se necesita proceder a la extracción. Para poder realizar el análisis el extracto tiene que ser relativamente puro.

Este método requiere laboratorios especiales y el tiempo total necesario para el análisis es demasiado largo para su aplicación práctica.

Van Weemen (1974) , ha utilizado un enzima como marcador de la hormona en vez de un radio-isótopo, lo que ofrece varias ventajas: la hormona marcada con el enzima es mucho más estable que la radio marcada y por lo tanto puede almacenarse más tiempo, evita el trabajar con compuestos radioactivos, el tiempo total de análisis es más corto y el sistema ofrece unas posibilidades muy buenas de automatización.

III.2. MATERIAL Y METODOS.

III.2.1. Determinación de sustancias antitiroideas.

La determinación de sustancias antitiroideas se llevó a cabo a partir de muestras obtenidas de tiroides, de hígado (lóbulo de Spigelio) y de musculatura cervical inferior.

Para la estimación de las sustancias antitiroideas se siguieron dos métodos, uno cualitativo y otro cuantitativo.

III.2.1.1. Método cualitativo.

Corresponde, en esencia, al método descrito por Brabander y Verbeke (1975).

A) Extracción y purificación.

Se pesó una cantidad conocida de muestra (alrededor de 2 gramos) y se trituró y homogeneizó en un aparato M.S.E. con 5 volúmenes de metanol. La mezcla se agitó enérgicamente durante 20 minutos y después se centrifugó a 2.000g. durante 3 minutos. Se decantó el sobrenadante y se acidificó con 1 ml. de ClH 1N. Los lípidos apolares se eliminaron mediante lavados sucesivos (3 veces) con éter de petróleo (40-60°) con la ayuda de embudos de separación.

La purificación se realizó en resina Dowex 50W-X8 para lo cual se relleno una columna de vidrio (300 x 9 mm.) con las suspensiones acuosas de ésta resina (previamente lavada, como se señala en - II.2.2.) hasta una altura de 150 mm. Antes de su uso se sustituyó el agua destilada por metanol del 75% haciendo pasar varias veces por la columna dicho eluyente.

El extracto, disuelto en un volumen de unos 10 ml. de meta-

nol, se colocó en el lecho cromatográfico y se hizo pasar a través de la columna con un flujo de 2 ml/minuto aproximadamente; posteriormente la columna se trató con metanol del 75%. Todas las fracciones se recogieron conjuntamente y se evaporaron en un rotovapor a 40°C. El extracto concentrado (1 ml.) se mezcló con 5 volúmenes de tampón fosfato 0,2M pH 8 y con 0,5 volúmenes de metanol. El pH se ajustó a 8. Los lípidos polares se extrajeron posteriormente lavando 3 veces con éter etílico. Se recogió la fracción acuoso-metanólica y se liberó del éter disuelto con ayuda de una corriente de nitrógeno.

8) Reacción.

Al extracto obtenido en el apartado anterior se le añadió - 0,1 ml. de una solución acetónica al 0,25% de Cl-NBD (7-cloro-4-nitrobenzo-2 oxa-1,3 diazol) preparada inmediatamente antes de su uso. La reacción para formar los Cl-NBD derivados se llevó a cabo en la oscuridad a 40°C. en un baño maría durante una hora. Una vez concluida la reacción se dejó enfriar y se le añadieron 0,5 volúmenes de éter etílico y se acidificó con ClH 1N hasta un pH de 3-4. Trás una agitación - enérgica se recogieron las fracciones etéreas procedentes de 3 ó 4 extracciones, las cuales contenían los derivados tireostáticos. La pequeña porción acuosa que acompaña siempre al éter se liberó mediante la adición de sulfato sódico anhidro y posterior filtración. El volumen final se concentró hasta unos 0,2-0,5 ml. mediante evaporación del éter en un rotovapor.

Como patrones se utilizaron soluciones metanólicas al 0,02% de cada uno de los siguientes antitiroideos suministrados por "Merck": 4(6) propil-2-tiouracilo (PTU), 4(6) metil-2-tiouracilo (MTU), 2-tio-

uracilo (TU) y 2-mercapto-1-metilimidazol o "Tapazol" (TAP). Los derivados del Cl-NBD se formaron de la misma forma que la descrita para la muestra.

C) Cromatografía en capa fina.

Los extractos, junto con los patrones, se cromatografiaron en placas de sílica gel G-60 y sílica gel G-25HR preparadas según se describe en II.2.2. utilizando como fase móvil, en ambos casos, cloroformo/etanol (95/5) (v/v). La cromatografía se desarrolló en cubetas que no estaban saturadas de disolventes.

Las sustancias antitiroideas se pusieron de manifiesto pulverizando las placas con una mezcla 1/50 (v/v) de cisteína al 3% y etanol/isopropanol/amoníaco del 25% (50/50/2) (v/v/v) preparada inmediatamente antes de su uso.

Los antitiroideos aparecen como manchas amarillo-verdosas - cuando se observan a la luz ultravioleta a 366 nm.

Con el fin de comprobar el comportamiento cromatográfico de las sustancias antitiroideas, se cromatografiaron los patrones mencionados anteriormente en sílica gel G-60 y sílica gel G-25HR. A pesar de las recomendaciones de Brabander y Verbeke (1975) sobre la conveniencia de utilizar sílica gel G-60, en nuestras condiciones experimentales no hubo diferencia alguna con la sílica gel G-25HR como puede observarse en la figura 2. Los Rfs. presentaron unos valores muy aproximados (tabla I). Para la identificación de los tiouracilos en las muestras, se utilizó en todos los casos, sílica gel G-60. Los Rfs. se compararon con las manchas patrones.

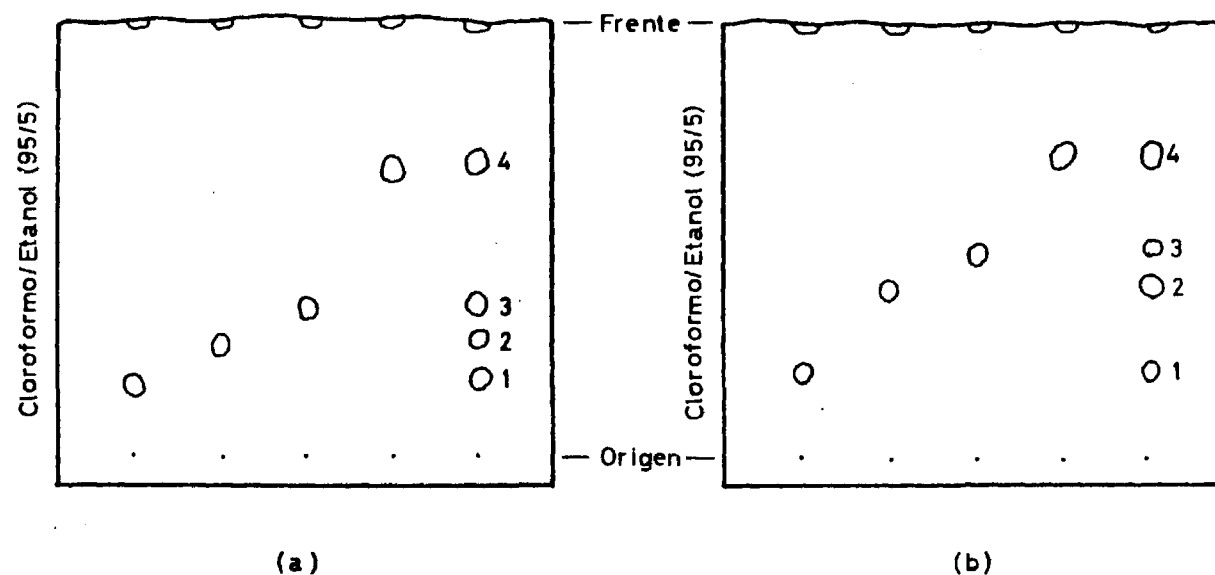


FIGURA 2: CROMATOGRAMAS EN CAPA FINA DE SILICA GEL G-60(a) Y SILICA GEL G-25HR(b). REVELADOR: REACTIVO DE CISTEINA. MANCHA 1: TU; MANCHA 2: MTU; MANCHA 3: PTU; MANCHA 4: TAP. TODAS LAS MANCHAS PRESENTARON UN COLOR AMARILLO-VERDOSO.

TABLA I.

Valores $R_f \times 100$ de las sustancias antitiroideas patrones.

Placa	TU	MTU	PTU	TAP
SIL G-60	17	25	34	67
SIL G-25HR	20	39	46	70

Fase móvil = Cloroformo:etanol (95:5).

Cubetas no saturadas.

TU = 2-tiouracilo; MTU = 4(6) metil-2-tiouracilo; PTU = 4(6) propil-2-tiouracilo; TAP = 2-mercapto-1-metilimidazol o "tapazol".

III.2.1.2. Método cuantitativo.

El análisis cuantitativo se efectuó de acuerdo con el método descrito por Van Waes (1973).

A) Extracción.

Una muestra conocida de tejido (an torno a 20 gramos) se homogeneizó en un aparato M.S.E. y se mantuvo en agitación durante 30 minutos con 5 volúmenes de metanol. Posteriormente se filtró teniendo la precaución de arrastrar con más metanol la totalidad de las sustancias antitiroideas.

El disolvente se evaporó a 40°C. en un rotovapor hasta un volumen de unos 25 ml. que se pasaron a un embudo de separación arrastrando cuantitativamente las sustancias antitiroideas, primero con un volumen igual de agua destilada y después con 2 volúmenes de éter etílico. Trás la separación de las fases, se recogió la acuosa y la etérea se volvió a lavar con otro volumen de agua destilada que se añadió a la primera.

Los disolventes se evaporaron hasta la sequedad con la ayuda de un rotovapor a 40°C. teniendo la precaución de añadir previamente - una gota de silicona ("Fluka"), para evitar la formación de espuma.

B) Cromatografía.

Se llevó a cabo en columnas de vidrio de 300 x 16 mm.

B.1. Empaquetado de la columna.

Se depositó óxido de aluminio previamente activado (véase - II.2.2.) en un mortero y se le añadió cloroformo/metanol (1/1) (v/v). Alcanzada la perfecta homogeneización del óxido de aluminio en la -

mezcla de disolventes, la suspensión se introdujo en la columna de vidrio que se tapó con algodón cuidando siempre que el nivel de la mezcla de disolventes cubriese al menos el tapón de algodón, para evitar la de secación de la porción superior de la columna.

B.2. Desarrollo de la cromatografía.

Al extracto obtenido en A se le añadió cloroformo/metanol - (1/1) (v/v) y los disolventes junto con la porción disuelta en la mezcla, se depositaron en la columna. Como eluyentes se utilizaron primero cloroformo/metanol (1/1) (v/v) y después metanol del 100%. Posteriormente, al residuo del extracto que no se había disuelto en cloroformo/metanol (1/1) (v/v) se le añadió metanol del 75% con lo que la muestra quedó totalmente disuelta y se pasó por la columna. Se recogieron solamente las sustancias eluidas con metanol del 75%, lo que se consiguió desechando los primeros volúmenes (7-8 ml.). Para recoger cuantitativamente toda la muestra se hizo un segundo lavado del matraz original con metanol del 75%, que también se pasó por la columna.

Durante toda la cromatografía, se protegieron de la luz, tanto la columna como los extractos recogidos, con ayuda de un paño negro.

El eluato total se evaporó hasta sequedad a 40°C. en un rotovapor.

C) Determinación colorimétrica.

Al extracto obtenido en B.2. se le añadió 1 ml. de una solución de 2,6 dicloro-quinona-cloroimida al 0,04% en isopropanol y 20 volúmenes de tampón tris 0,25M pH 7,6 y se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente, durante los cuales se desarrolló una colora ción amarillenta.

La disolución se trasvasó cuantitativamente a un embudo de separación y se estrajo 3 veces con 4, 4 y 3 ml. de cloroformo respectivamente.

Los extractos clorofórmicos se recogieron conjuntamente y se les añadió la cantidad suficiente de cloroformo para obtener un volumen final de 10 ml. que se filtró a través de papel Whatman - número 1.

La densidad óptica se leyó a 435 nm. contra un blanco de - cloroformo y las lecturas se refirieron a una gráfica patrón preparada con metil-tiouracilo (figura 3) tratado de la misma forma.

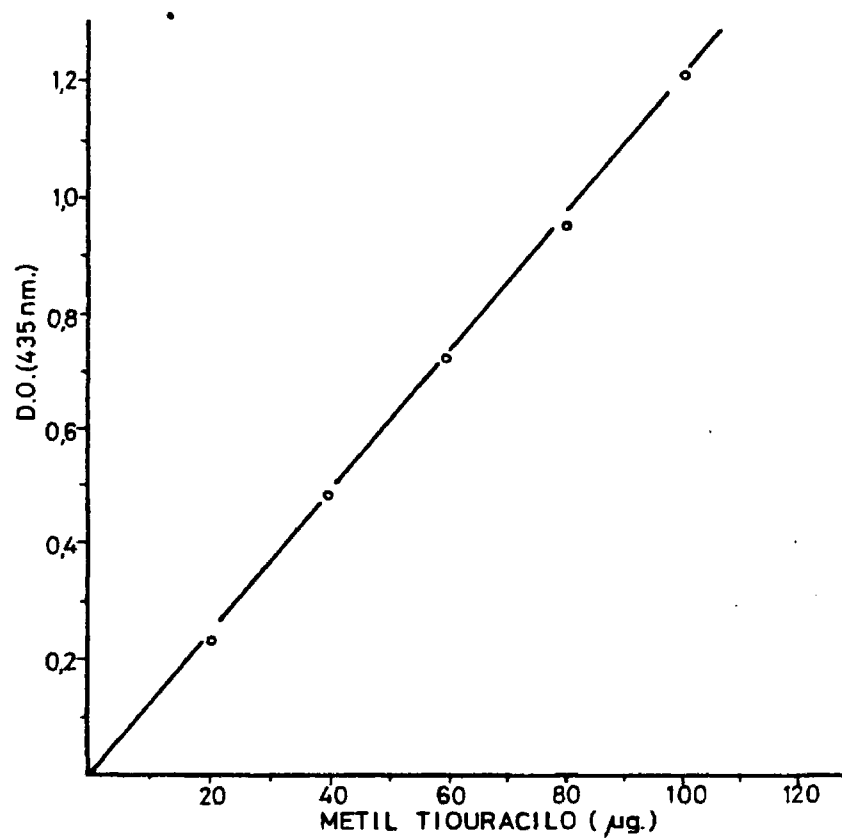


FIGURA 3: GRAFICA PATRON PARA LAS DETERMINACIONES DE METIL TIOURACILO (MTU) POR EL METODO DE VAN WAES (1973).

III.2.2. Determinación de estrógenos

La determinación de estrógenos se llevó a cabo en muestras obtenidas a partir del hígado y de la musculatura cervical inferior de diversos animales de la especie bovina.

III.2.2.1. Extracción y purificación.

La extracción se realizó siguiendo en esencia el método de Smith y McNeil (1972). Para ello, se pesó una cantidad conocida de muestra (en torno a 20 gramos) y se trituró y homogeneizó durante unos dos minutos en un aparato "M.S.E" con cinco volúmenes de una mezcla de acetónitrilo/agua (9/1) (v/v). El homogeneizado resultante se acidificó con ClH 5N (1 ml.) y se hirvió a reflujo durante 30 minutos, posteriormente se filtró en embudo Büchner a través de papel Whatman Nº 1 y se lavó dos veces con n-hexano, en un embudo de separación, con el fin de eliminar muchas de las sustancias que acompañan a los estrógenos. A continuación se le añadió benceno a la fase acuosa y se lavó otras dos veces con una solución de CO_3Na_2 al 10% para eliminar las sustancias ácidas (principalmente ácidos grasos) arrastradas con los estrógenos.- Se eliminó la fase inferior y la orgánica se purificó mediante lavado (dos veces) con agua destilada. Posteriormente, se le añadió un volumen igual de una solución de NaOH al 1%; tras una agitación enérgica se recogió la fase inferior eliminando la fase orgánica. A continuación, se acidificó con ClH concentrado (2 ml.) y se le añadieron 20 ml. de benceno. Después de agitación y separación de las fases se recogió la solución bencénica que contiene los estrógenos.

El benceno se eliminó con la ayuda de un rotovapor, sumergiendo el matraz que contenía las muestras en un baño de agua a 40°C. Para

su aplicación en la línea de origen de la placa cromatográfica se disol
vió en 1 ml. de etanol.

III.2.2.2. Identificación.

Se llevó a cabo por fraccionamiento mediante cromatografía en
capa fina y posterior revelado de las manchas. Para ello se siguió la
metodología descrita por Ferrando y Renard, (1968).

a) Colocación de la muestra.

Sobre la capa de sílica gel se depositaron 50 μ l. de una solu-
ción etanólica de cada muestra, procurando no dañar la superficie de la
capa. Como patrones se emplearon 50 μ l. de una solución etanólica al
0,125% de cada uno de los siguientes estrógenos: dietilestilbestrol
cis (DES cis), dietilestilbestrol trans (DES trans), dienestrol (DN),
hexestrol (HX) y estradiol (ES), o bien una mezcla a partes iguales de
los mismos.

b) Desarrollo de las cromatografías y revelado de las placas.

El desarrollo de las cromatografías tuvo lugar en cámaras sin
saturar, dándose por concluido cuando el frente de la fase móvil se -
aproximaba a los 4 cm. del borde superior de la placa.

La técnica original de Ferrando y Renard (1968) utiliza dos
fases móviles; una compuesta por éter de petróleo/éter etílico (4/6)
(v/v), con lo cual se separan los estereoisómeros (formas cis y trans)
del dietilestilbestrol, el hexestrol y el dienestrol. Para separar el
estrógeno naturalmente presente en el organismo, el estradiol, las pla-
cas se desarrollan con benceno/éter etílico (4/6) (v/v). De acuerdo -
con nuestras experiencias, ambas fases móviles permiten una clara iden-

tificación de todos los estrógenos citados (figura 4), aún cuando con éter de petróleo/éter etílico se distinguían mejor las manchas por lo que se utilizó este sistema en todas las experiencias posteriores.

El revelado se realizó, en todos los casos, con el reactivo de Vainillina (Metz, 1961) [solución de vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) al 1% en ácido ortofosfórico al 50%]. Las placas una vez pulverizadas se mantuvieron a 120°C durante 10 minutos con lo que el dietilestilbestrol (cis y trans) y el dienestrol toman una tonalidad azulada y tras 25 minutos a 120°C. el hexestrol se torna de color rojo. El estradiol adquiere una coloración verdosa oscura tras 15 minutos de tratamiento térmico.

Aunque Ferrando y Renard (1968) concluyen en su trabajo que en las placas desarrolladas con éter de petróleo/éter etílico (4/6) - (v/v), el DES-trans, el dienestrol y el hexestrol presentan unos Rfs., aunque próximos, lo suficientemente distintos para permitir la identificación de cada uno de ellos, en nuestras experiencias y basados exclusivamente en los Rfs., sólo pudieron identificarse claramente el DES-trans y el dienestrol si en la mezcla no estaba incluido el hexestrol; cuando lo estaba la identificación fue más difícil debido a que el hexestrol presenta un Rf. igual o muy próximo al del DES-trans.

Su identificación se realizó atendiendo a los Rfs. y al color de las manchas; el hexestrol originaba una mancha de color rojo de Rf 0,61 con un halo rosado y sobre ella se apreciaban dos manchas de color azul de Rfs. 0,62 y 0,60 perfectamente distinguibles que correspondían al DES-trans y dienestrol respectivamente (véase figura número 4 b).

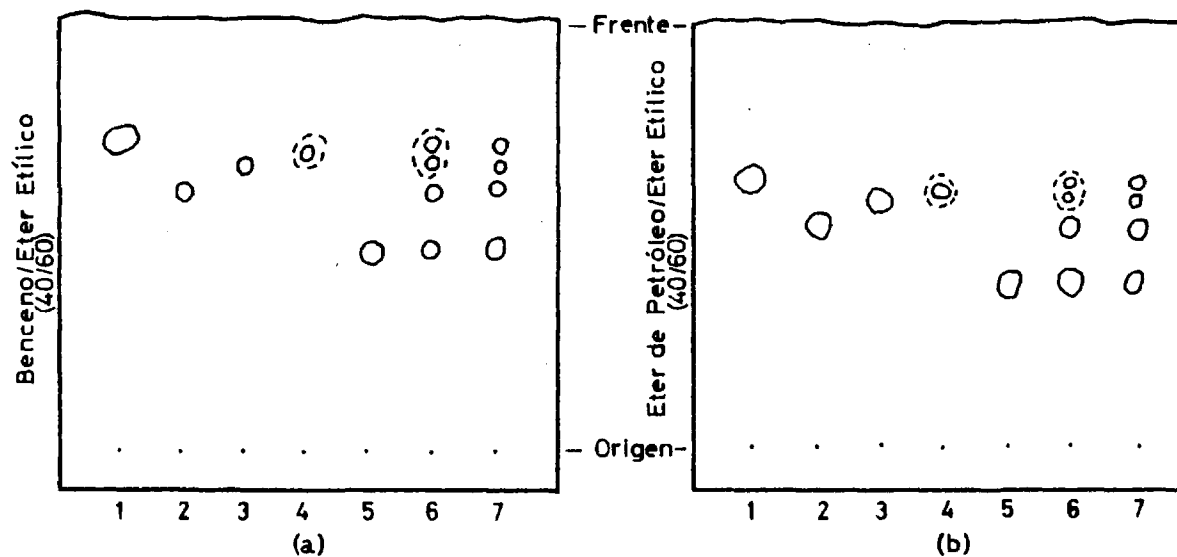


FIGURA 4: CROMATOGRAMAS EN CAPA FINA DEL ESTRADIOL (ES) Y DE LOS ESTROGENOS SINTETICOS MAS CORRIENTEMENTE EMPLEADOS: DES-trans, DES-cis, DIENESTROL (DN) Y HEXESTROL (HX).
 1-DES trans, 2-DES cis, 3-DN, 4-HX, 5-ES,
 6-MEZCLA DE DES trans, DES cis, DN, HX Y ES,
 7-MEZCLA DE DES trans, DES cis, DN Y ES.

III.3. RESULTADOS Y DISCUSION.

III.3.1. Sustancias antitiroideas.

III.3.1.1. Características de los animales y modificaciones macroscópicas del tiroides, musculatura cervical inferior e hígado.

Las muestras utilizadas (tiroides, hígado y musculatura cervical inferior) para evidenciar la presencia de sustancias antitiroideas se obtuvieron de animales de la especie bovina de edades comprendidas entre 12 y 14 meses, procedentes de diversas provincias de Castilla y Extremadura. Las muestras obtenidas a partir del hígado y de la musculatura cervical inferior fueron, en todos los casos, de un peso de alrededor de 500 gramos y se recogieron según se describe en II.3.1.1. La glándula tiroides se extrajo totalmente.

La tabla II muestra los pesos de la canal y del tiroides de cada uno de los animales estudiados, así como la edad y la provincia de donde procedían.

Todos los animales tuvieron un peso canal comprendido entre los 210 y 354 Kilogramos. El peso de la glándula tiroides osciló ampliamente pero, en cualquier caso, siempre fué superior al normal del descrito en los tratados de anatomía (entre 21 y 36 gramos), excepto en los animales números 19, 20 y 21 cuyos pesos estuvieron comprendidos entre los límites descritos. El tamaño de los restantes fue excesivamente grande llegando incluso en uno de ellos (número 15) hasta un peso de unas 15 veces superior al considerado normal.

Este aumento de tamaño ha sido constatado por cuantos experimentalmente han incluido en el pienso de los animales fármacos antitiroideos (Astwood, 1943; Fields, 1957; Tiecco y Valfré, 1970; Griem, -

TABLA II.

Características de los animales utilizados en este estudio y peso de la glándula tiroides de cada uno de ellos.

Animal Nº	Edad (meses)	Peso canal (Kg.)	Procedencia	Peso Tiroides (g.)
1	12	316	Cáceres	59
2	12	270	Badajoz	128
3	12	320	Badajoz	135
4	12	321	Badajoz	60
5	13	316	Ciudad Real	135
6	13	352	Ciudad Real	174
7	14	325	Segovia	166
8	12	260	Segovia	109
9	14	334	Segovia	148
10	13	210	Segovia	132
11	14	247	Segovia	104
12	12	253	Segovia	84
13	13	354	Cáceres	94
14	14	315	Cáceres	91
15	13	321	Cáceres	330
16	12	269	Badajoz	120
17	13	300	Badajoz	93
18	12	303	Badajoz	104
19	12	257	Toledo	22
20	13	279	Toledo	29
21	12	295	Toledo	25
22	14	300	Avila	257
23	12	326	Avila	107
24	12	260	Avila	83

1975; etc.).

Aunque algunos de los entradores aseguraron que a los animales no se les había administrado fármaco alguno, fué imposible encontrar en los animales estudiados un tiroides normal que sirviese de control, dado que los análisis que posteriormente se realizaron revelaron la presencia de metil-tiouracilo en estas glándulas; posiblemente ello sea consecuencia del empleo rutinario de los antitiroideos en muchos de los piensos compuestos que hoy oferta la industria, a pesar de que la incorporación de estas sustancias a los alimentos del ganado esté prohibida desde el 30 de junio de 1977, como más atrás se indica. Rodríguez Marín (1979) participa también de esta opinión.

Debe hacerse constar, sin embargo, que los animales comprendidos entre los números 1 y 14 se sacrificaron en una época en la que no estaba específicamente prohibido el uso de antitiroideos en alimentación animal y los últimos, quizás recibieron pienso elaborado antes de la prohibición, puesto que como se ha dicho, la incorporación de estos "finalizadores" al pienso se ha llevado a cabo de una forma rutinaria. Cabe suponer, por tanto, que incluso ignorándolo el entrador o ganadero, los animales hayan estado recibiendo sustancias antitiroideas.

La figura 5 muestra dos fotografías de glándulas hipertrofiadas, procedentes de los animales números 7, 9 y 12 respectivamente. Las medidas descritas para cada lóbulo de un tiroides normal en animales -añejos son de unos 5 cm. de longitud y 4 cm. de anchura (Sáenz Egaña, 1967). Los tiroides que se muestran en la figura 5 dieron las siguientes medidas: animal número 7, aproximadamente 9,5 x 8 cm.; animal número 9, unos 9 x 6,5 cm. y animal número 12, aproximadamente 7,5 x 6,5 cm.

Respecto al color observado en la carne, es necesario apuntar

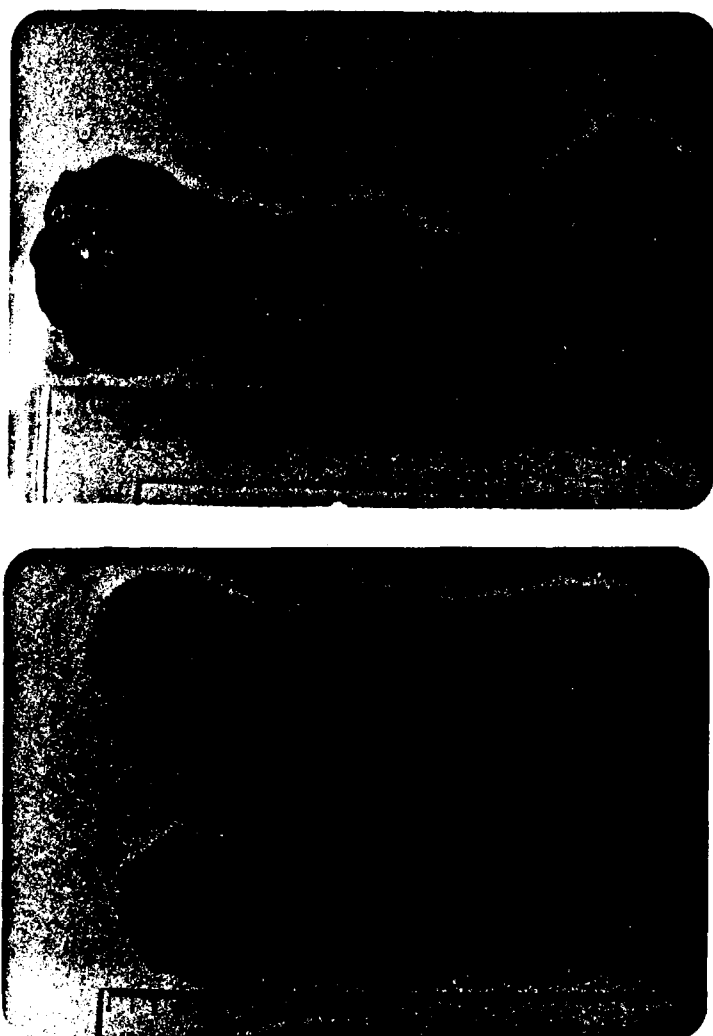


Figura 5: Tiroides hipertrofiados procedentes de los animales 7 (superior), 9 (centro) y 12 (inferior).

que macroscópicamente se apreciaba una tonalidad pálida, fácilmente distinguible de la tonalidad púrpura de la mioglobina. Esta alteración del color muscular se debe sin duda a la dilución de los pigmentos de la carne en el líquido intersticial que es excesivo y, por supuesto, mucho mayor que en la musculatura de los animales que no reciben tireostáticos.

El hígado, sin embargo, presentó un color normal, no apreciándose modificación macroscópica alguna.

III.3.1.2. Identificación de las sustancias antitiroideas.

Alicuotas de los extractos obtenidos según se describe en - III.2.1.1. (aproximadamente 20 μ l.), se cromatografiaron en placas de capa fina preparadas con sílica gel G-60 y se desarrollaron con cloroformo/etanol (95/5) (v/v). Las láminas se revelaron con el reactivo de cisteína (III.2.1.1.C.). En todos los extractos, tanto de tiroides como de hígado y musculatura cervical inferior, se detectaron algunas de las diferentes sustancias antitiroideas.

En las figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13, se muestran los resultados obtenidos al someter a cromatografía extractos procedentes de la glándula tiroides, hígado y carne de la musculatura de la región cervical inferior, procedentes de los animales estudiados. La enumeración de las manchas se ha realizado de acuerdo con el orden que se indica en la figura 6, que es un mapa cromatográfico de la mezcla de patrones y del extracto de la muestra de tiroides número 2, que fué la que dió lugar a un mayor número de manchas. Todas las manchas, incluso las no identificadas, presentaron un color amarillo-verdoso, cuando se revelaron con el reactivo de cisteína.

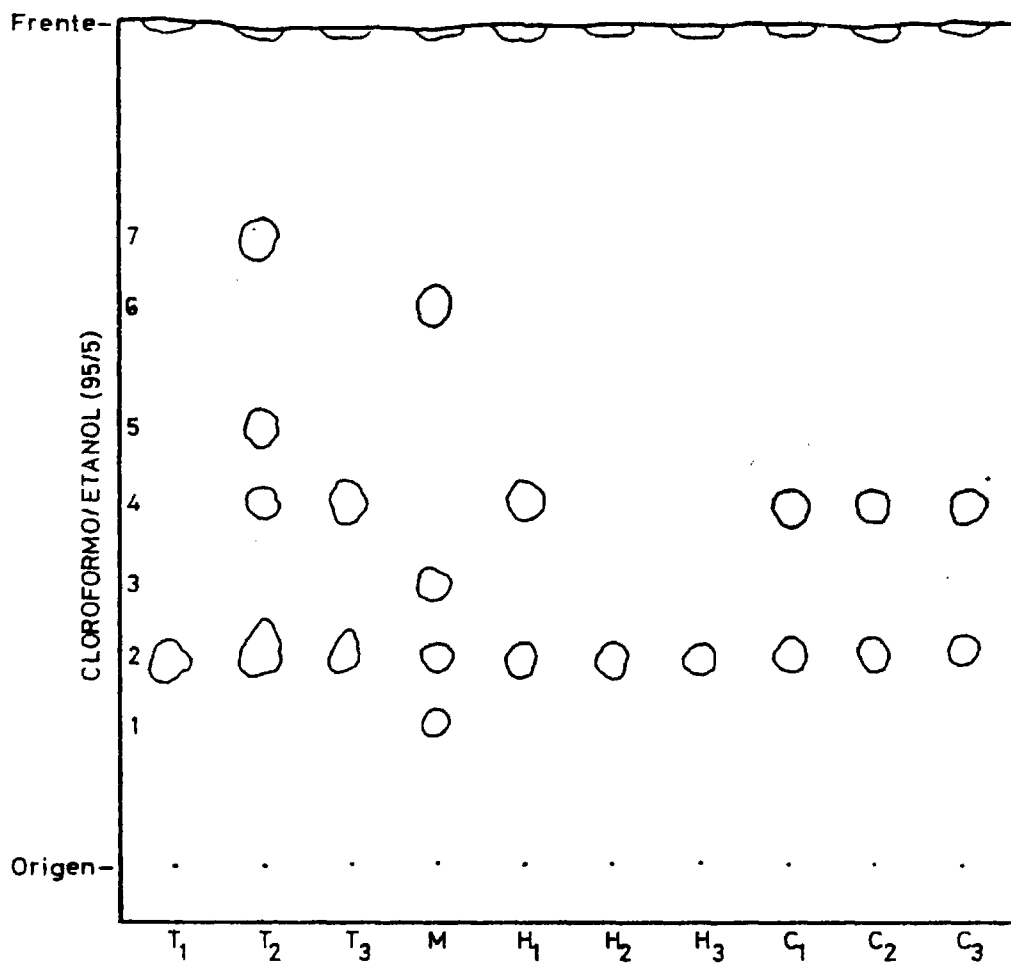


FIGURA 6: CROMATOGRAMA EN CAPA FINA DE SILICA GEL G-60 DE LOS EXTRACTOS DE TIROIDES (T), HIGADO (H) Y MUSCULATURA CERVICAL INFERIOR (C) PROCEDENTES DE LOS ANIMALES 1, 2 Y 3 DE LA TABLA II, Y DE UNA MEZCLA DE PATRONES DE TIURACILO (1), METIL-TIURACILO (2), PROPIL-TIURACILO (3) Y TAPAZOL (6).

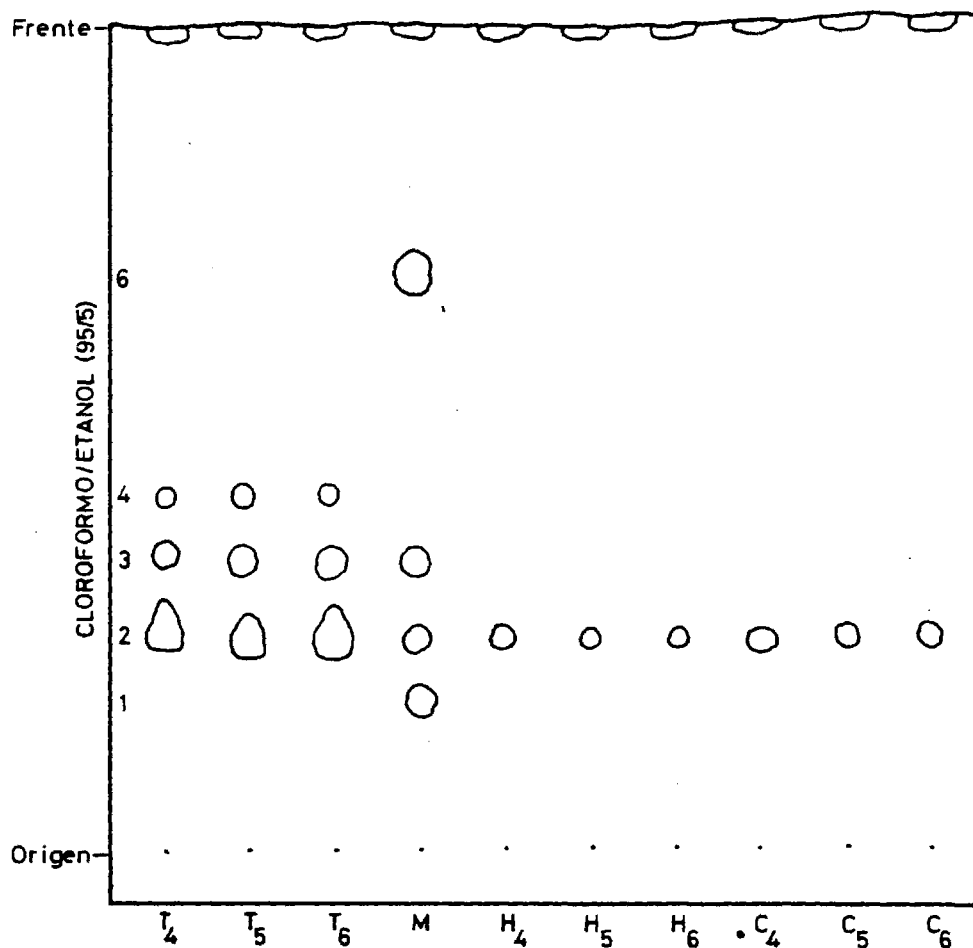


FIGURA 7: CROMATOGRAMA EN CAPA FINA DE SILICA GEL G-60 DE LOS EXTRACTOS DE TIROIDES (T), HIGADO (H) Y MUSCULATURA CERVICAL INFERIOR (C) PROCEDENTES DE LOS ANIMALES 4, 5 Y 6 DE LA TABLA II, Y DE UNA MEZCLA DE PATRONES DE TIURACILO (1), METIL-TIURACILO (2), PROPIL-TIURACILO (3) Y TAPAZOL (6).

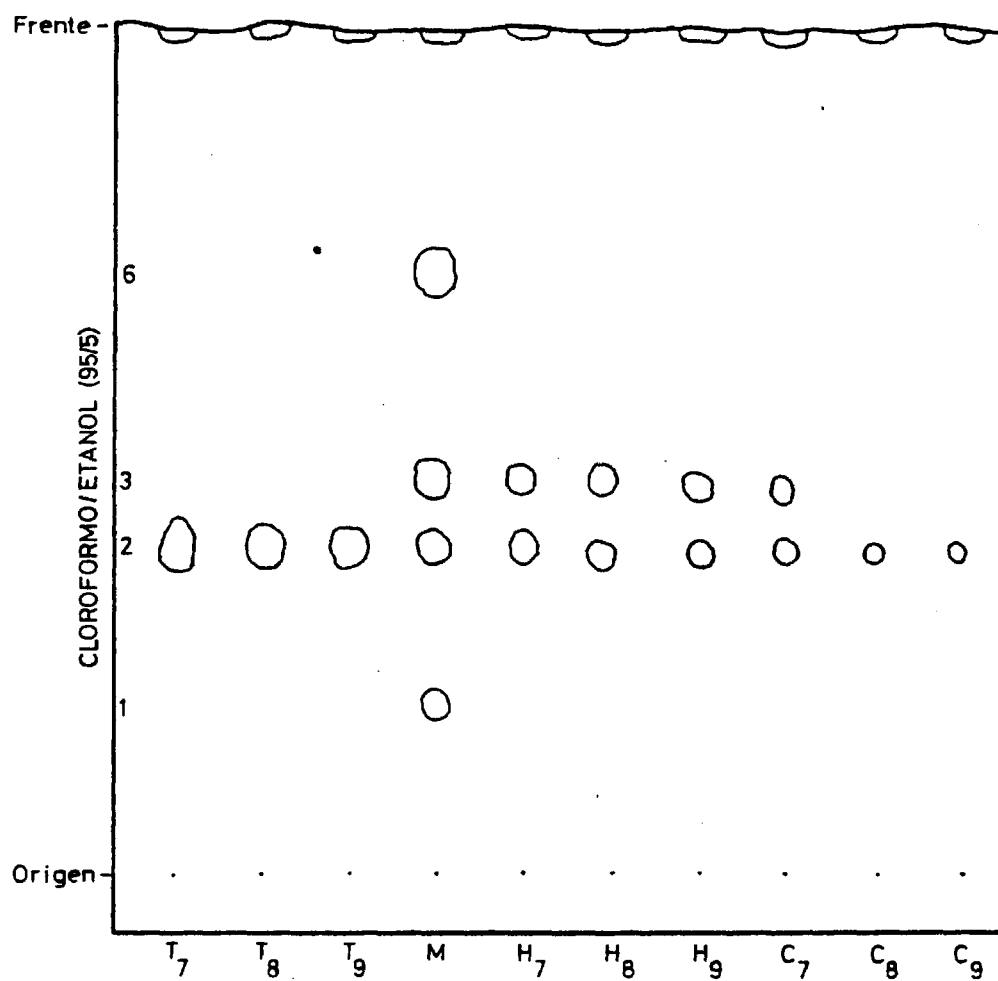


FIGURA 8: CROMATOGRAMA EN CAPA FINA DE SILICA GEL G-60 DE LOS EXTRACTOS DE TIROIDES (T), HIGADO (H) Y MUSCULATURA CERVICAL INFERIOR (C) PROCEDENTES DE LOS ANIMALES 7, 8 Y 9 DE LA TABLA II, Y DE UNA MEZCLA DE PATRONES DE TIURACILO (1), METIL-TIURACILO (2), PROPIL-TIURACILO (3) Y TAPAZOL (6).

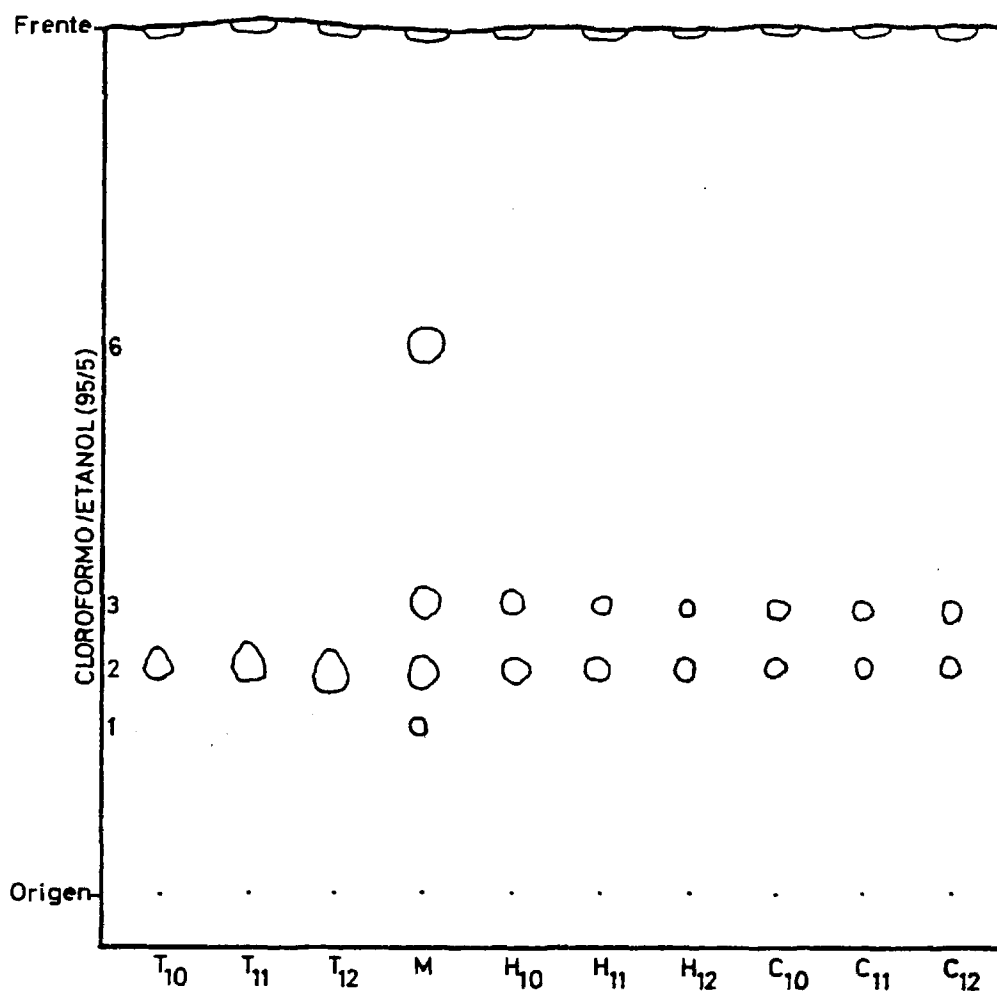


FIGURA 9: CROMATOGRAMA EN CAPA FINA DE SILICA GEL G-60 DE LOS --
EXTRACTOS DE TIROIDES (T), HIGADO (H) Y MUSCULATURA CERVICAL INFERIOR
(C) PROCEDENTES DE LOS ANIMALES 10, 11 Y 12 DE LA TABLA II, Y DE UNA
MEZCLA DE PATRONES DE TIURACILO (1), METIL-TIURACILO (2), PROPIL-TIO
URACILO (3) Y TAPAZOL (6).

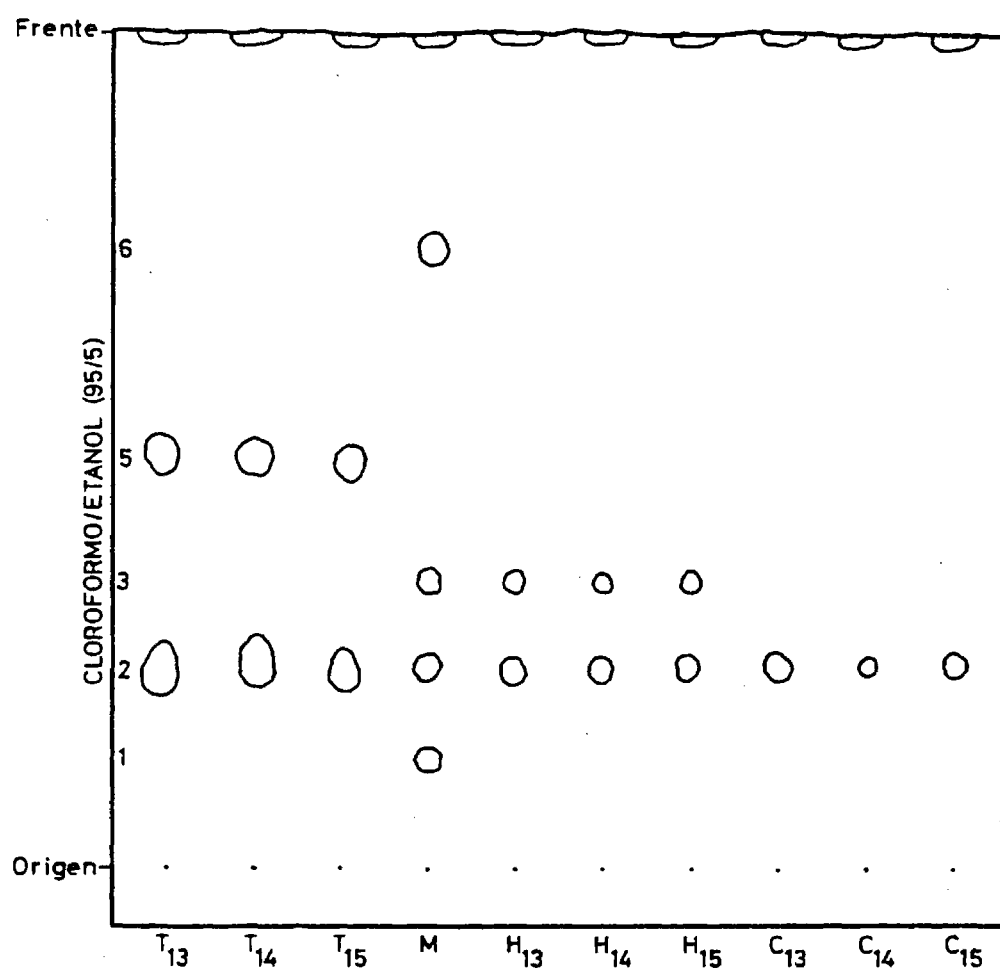


FIGURA 10: CROMATOGRAMA EN CAPA FINA DE SILICA GEL G-60 DE LOS EXTRACTOS DE TIROIDES (T), HIGADO (H) Y MUSCULATURA CERVICAL INFERIOR (C) PROCEDENTES DE LOS ANIMALES 13, 14 Y 15 DE LA TABLA II, Y DE UNA MEZCLA DE PATRONES DE TIURACILO (1), METIL-TIURACILO (2), PROPIL-TIURACILO (3) Y TAPAZOL (4).

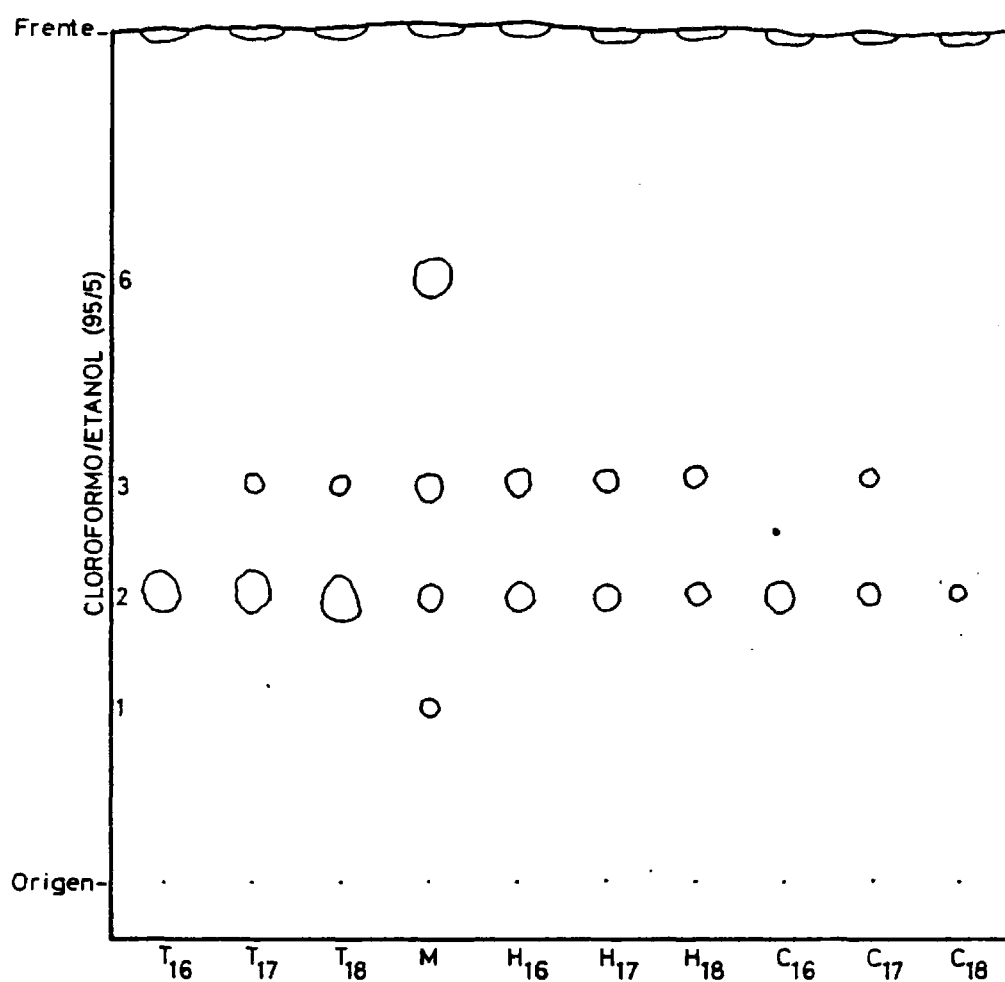


FIGURA 11: CROMATOGRAMA EN CAPA FINA DE SILICA GEL G-60 DE LOS EXTRACTOS DE TIROIDES (T), HIGADO (H) Y MUSCULATURA CERVICAL INFERIOR (C) PROCEDENTES DE LOS ANIMALES 16, 17 Y 18 DE LA TABLA II, Y DE UNA MEZCLA DE PATRONES DE TIOURACILO (1), METIL-TIOURACILO (2), PROPIL-TIOURACILO (3) Y TAPAZOL (6).

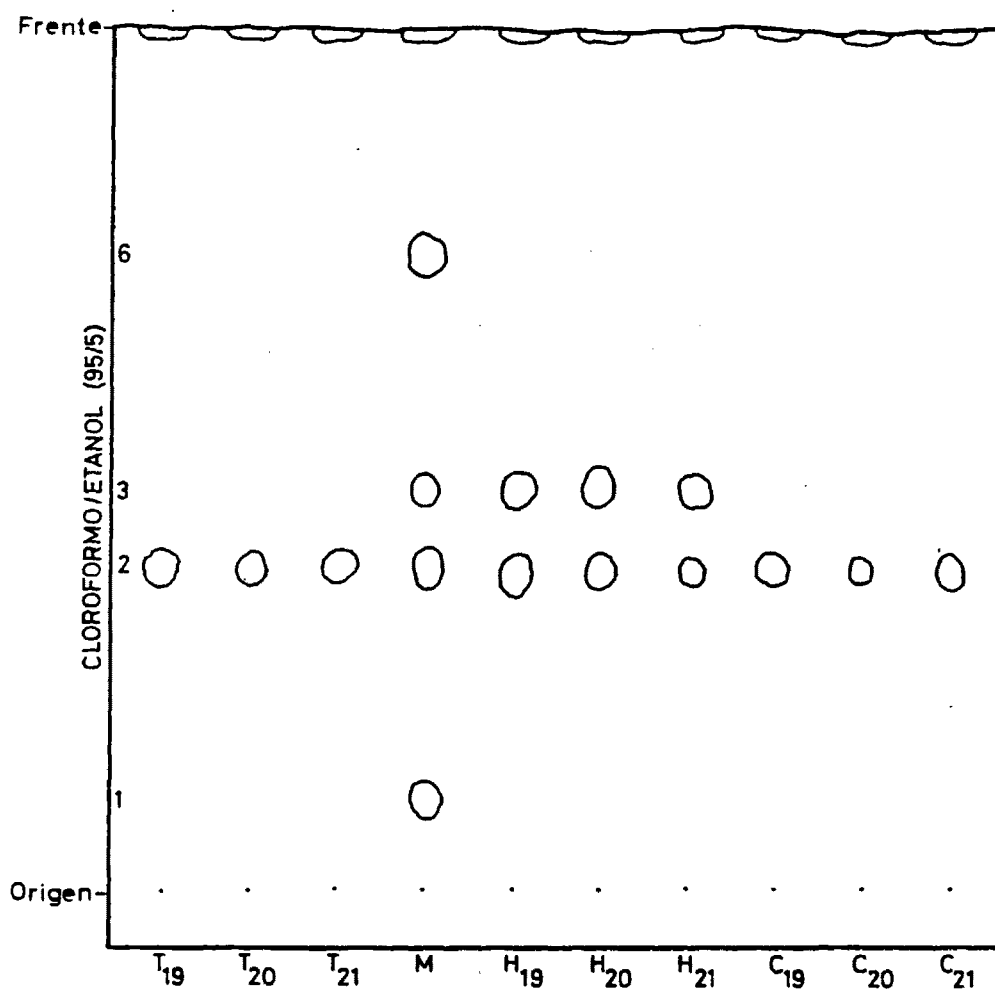


FIGURA 12: CROMATOGRAMA EN CAPA FINA DE SILICA GEL G-60 DE LOS EXTRACTOS DE TIROIDES (T), HIGADO (H) Y MUSCULATURA CERVICAL INFERIOR (C) PROCEDENTES DE LOS ANIMALES 19, 20 Y 21 DE LA TABLA II, Y DE UNA MEZCLA DE PATRONES DE TIURACILO (1), METIL-TIURACILO (2), PROPIL-TIURACILO (3) Y TAPAZOL (6).

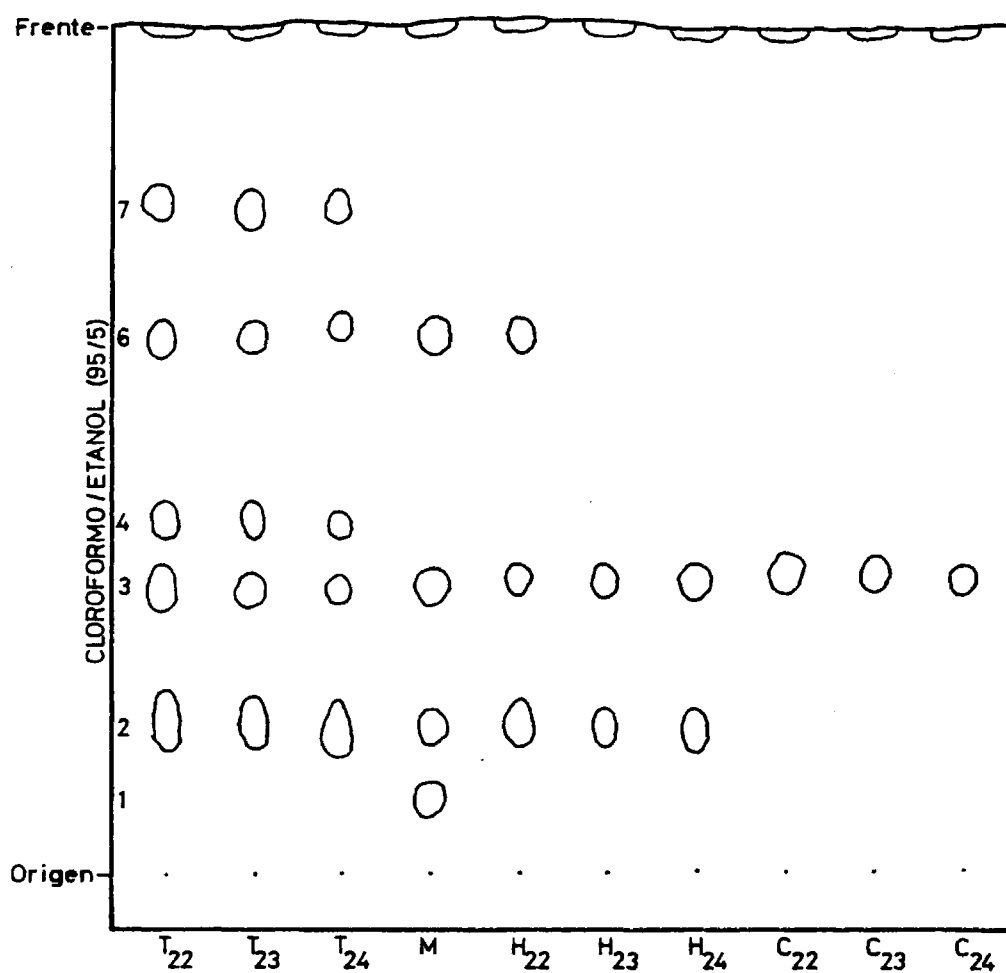


FIGURA 13: CROMATOGRAMA EN CAPA FINA DE SILICA GEL G-60 DE LOS EXTRACTOS DE TIROIDES (T), HIGADO (H) Y MUSCULATURA CERVICAL INFERIOR (C) PROCEDENTES DE LOS ANIMALES 22, 23 Y 24 DE LA TABLA II, Y DE UNA MEZCLA DE PATRONES DE TIOURACILO (1), METIL-TIOURACILO (2), PROPIL-TIOURACILO (3) Y TAPAZOL (6).

Con la letra T, se designa a los extractos obtenidos del tiroides, la H corresponde a los del hígado y la C a los de la musculatura cervical inferior. Con la letra M se indica una mezcla, a partes iguales, de patrones de tiouracilo, metil-tiouracilo, propil-tiouracilo y tapazol.

La mancha número 1, de Rf 0,17, corresponde al tiouracilo, - sustancia que no se detectó en ninguna de las muestras de los tejidos analizados.

La mancha número 2, aparece en todos los extractos orgánicos estudiados, excepto en los procedentes de la musculatura cervical inferior de los animales números 22, 23 y 24. Dado que su color y Rf de 0,25, corresponden a los del metil-tiouracilo, se identificó como tal.

La mancha número 3, de Rf 0,34, se identificó como propil-tiouracilo al mostrar un Rf igual al patrón. Se encontró principalmente en los extractos procedentes del hígado (en el 70% de los casos) mientras que sólo se puso de manifiesto en un 30% de los procedentes de la musculatura cervical inferior y del tiroides.

La mancha número 4, de Rf 0,43, se apreció en 12 muestras de las cuales 8 (33,3%) procedían de tiroides. Aunque en los patrones que nosotros utilizamos no figuraba el fenil-tiouracilo, presumiblemente se trataría de este producto dado que su Rf se corresponde con el descrito por otros autores para el fenil-tiouracilo (Brabander y Verbeke, 1975). El aspecto de la mancha es también característico del fenil-tiouracilo.

La mancha número 5, que sólo se observó en cuatro muestras de tiroides, mostró un Rf de 0,52 y no hemos llegado a identificarla.

La mancha número 6, de Rf 0,67, se detectó en cuatro muestras, una de hígado y tres de tiroides; su situación cromatográfica, su aspec

to y el Rf, ya citado, corresponden a los del tapazol, por lo que se identificó como tal.

La mancha número 7 sólo se puso de manifiesto en cuatro muestras procedentes del tiroides; su Rf fue de 0,75 y no se logró identificar.

En todos los cromatogramas se observaron una serie de manchas que corrieron con el frente (Rf 0,98). Dichas manchas se deben al exceso de reactivo NBO-Cl que no reacciona con los antitiroideos.

La ausencia de tiouracilo en los extractos tisulares que hemos estudiado indica que en la práctica corriente de explotación animal, se prefieren sus derivados al producto puro. Prácticamente en todos los trabajos publicados se emplean como antitiroideos sus derivados metilo, propilo, etc., siendo el metil-tiouracilo el más utilizado, como afirman Quevauvillier y Binet (1962).

Aunque Böhnelt (1966) señaló que sólo el tiroides de los animales tratados contenían cantidades detectables de metil-tiouracilo, sustancia que según este autor nunca aparecía en otros tejidos, nosotros la hemos encontrado en los tres tipos de tejidos analizados (tiroides, hígado y musculatura cervical inferior). Del mismo parecer son Brabander y Verbek (loc. cit.) quienes afirman que la presencia de este antitiroideo en la glándula tiroides va siempre acompañada de su existencia en la carne, riñón e hígado.

El propil-tiouracilo es el derivado que se ha puesto de manifiesto en el 70% de los extractos de tiroides examinados y en el 30% de los procedentes de musculatura cervical y de hígado, con lo que estos resultados concuerdan con los encontrados por Bosco (1971) y Ryan, (1976).

La frecuencia con que se detectó el derivado fenilo (en 8 extractos tiroideos y 4 de hígado y musculatura cervical) y el tapazol, que sólo se encontró en cuatro muestras de tiroides, es mucho menor, lo que también han constatado cuantos se han preocupado por el problema - que nos ocupa.

De todos modos, conviene recordar que la detección más o menos frecuente de un antitiroideo determinado en los tejidos animales, es el reflejo de su presencia en el pienso de los animales; por lo tanto en última instancia será la industria farmacéutica la que de lugar al predominio de uno u otro compuesto, de acuerdo con las condiciones del mercado.

También influye en la detección más o menos frecuente de los antitiroideos en general el hecho señalado entre otros por Marcato - (1969) y Clements (1957) de la breve presencia de estas sustancias en el tejido muscular bovino, dado que rápidamente se metabolizan y transforman en productos biológicamente inertes; de acuerdo con el autor citado en primer lugar estos productos desaparecen unos 5 días después de suspendida su administración.

III.3.1.3. Cuantificación de las sustancias antitiroideas.

La determinación cuantitativa de las sustancias antitiroideas se efectuó por el método colorimétrico de Van Waes (1973), (véase - III.2.1.2.).

En primer lugar se comprobó la eficacia de dicho método analizando unas muestras de hígado, a las que previamente se les adicionaron unos 40 µg. de metil-tiouracilo/muestra, utilizando como control - una alícuota del mismo hígado sin tratar; se obtuvieron recuperaciones finales del orden del 80-85%. Estas recuperaciones entran dentro del

rango de las señaladas por Brabander y Verbeke (1975) y Laitem y Gaspar (1977). Ello significa que este método es apto para su empleo en tejidos animales.

Con el fin de cuantificar los posibles residuos antitiroideos en los animales que surten los mataderos españoles, los extractos obtenidos a partir de las muestras de tiroides, hígado y musculatura cervical inferior procedentes de los mismos animales utilizados en las experiencias que se describen en III.3.1.1., se hicieron reaccionar con una solución isopropanólica de 2,6 dicloroquinonimida al 0,04% y se recogieron en cloroformo. Posteriormente se midió la extinción a 435 nm. - contra un blanco de cloroformo, expresándose los resultados en términos de metil-tiouracilo ($\mu\text{g/g.}$).

La tabla III recoge los resultados obtenidos de las muestras de tiroides, hígado y musculatura cervical inferior de los diversos animales estudiados. En la mayoría de las muestras se detectaron cantidades apreciables de sustancias antitiroideas, pudiéndose observar que en las muestras de tiroides dichas cantidades eran superiores a las del hígado y musculatura cervical inferior, excepto en las muestras números 19, 20 y 21 en las cuales fueron similares.

Estos resultados son semejantes a los encontrados por Jarc y col. (1977) en Austria; Laitem y Gaspar ya citados, lo mismo que Trautmann y Hill (1960), quienes utilizando cromatografía en capa fina o cromatografía en fase gaseosa encontraron niveles comprendidos entre las cifras que nosotros hemos hallado.

Como era de esperar las concentraciones máximas se encuentran en el tejido tiroideo y las mínimas en la musculatura. Al estudiar la tabla citada se observan diferencias manifiestas entre las concentracio-

TABLA III.

Niveles de sustancias antitiroideas expresados en términos de metil tiouracilo ($\mu\text{g/g.}$), en el tiroides, hígado y musculatura cervical inferior procedentes de los animales descritos en la tabla II.

<u>ANIMALES</u>	<u>TIROIDES</u>	<u>HIGADO</u>	<u>MUSCULO</u>
1	9,00	2,85	0,25
2	10,00	3,50	0,80
3	12,40	2,23	0,85
4	12,58	2,53	2,05
5	9,30	3,93	1,98
6	11,50	2,90	2,13
7	11,60	2,95	1,88
8	12,70	1,75	0,45
9	12,20	2,00	0,68
10	10,40	1,85	1,60
11	8,60	2,13	0,88
12	9,80	1,83	0,50
13	11,64	3,93	0,35
14	12,20	1,15	0,28
15	11,70	2,33	0,45
16	12,40	2,95	1,40
17	7,40	0,90	0,30
18	9,70	1,00	0,40
19	0,43	0,35	0,30
20	0,43	0,33	0,23
21	0,50	0,45	0,43
22	12,90	1,95	1,92
23	12,20	2,73	1,63
24	11,80	1,08	0,88

nes halladas en diversos animales, lo que posiblemente se deba, a la suspensión de la administración del correspondiente tiouracilo en unos animales antes que en otros.

III.3.2. Estrógenos de síntesis.

Animales de la misma procedencia y características que los - utilizados para el estudio de las sustancias antitiroideas (III.3.1.) se emplearon para investigar la incidencia de estrógenos sintéticos en el hígado y en el músculo. La porción muscular se obtuvo, de igual modo, de la región cervical inferior.

III.3.2.1. Identificación de los estrógenos de síntesis.

Alicuotas (aproximadamente 50 μ l.) de los extractos obtenidos según se describe en III.2.2.1., se cromatografiaron en placas de capa fina preparadas con sílica gel G-60 y se desarrollaron con éter de petróleo/éter etílico (40/60) (v/v). Las láminas se revelaron con el reactivo de vainillina (III.2.2.2.b).

Con el fin de comprobar la eficacia de dicho método se tomaron muestras de carne, exentas de estrógenos, a las que previamente se les añadió una mezcla, a partes iguales, de dietilestilbestrol-cis - (DES-cis), dietilestilbestrol trans (DES-trans), dienestrol (DN), hexestrol (HX) y estradiol (ES) a la concentración de 0,125% cada uno, utilizando como control una muestra de la misma carne. Los extractos obtenidos se cromatografiaron junto a patrones y a una mezcla, a partes - iguales, de los mismos.

En la figura 14 se muestran los resultados obtenidos. Puede observarse que en la muestra de carne a la que se le añadió la mezcla de los estrógenos sintéticos pudieron detectarse todos y cada uno de

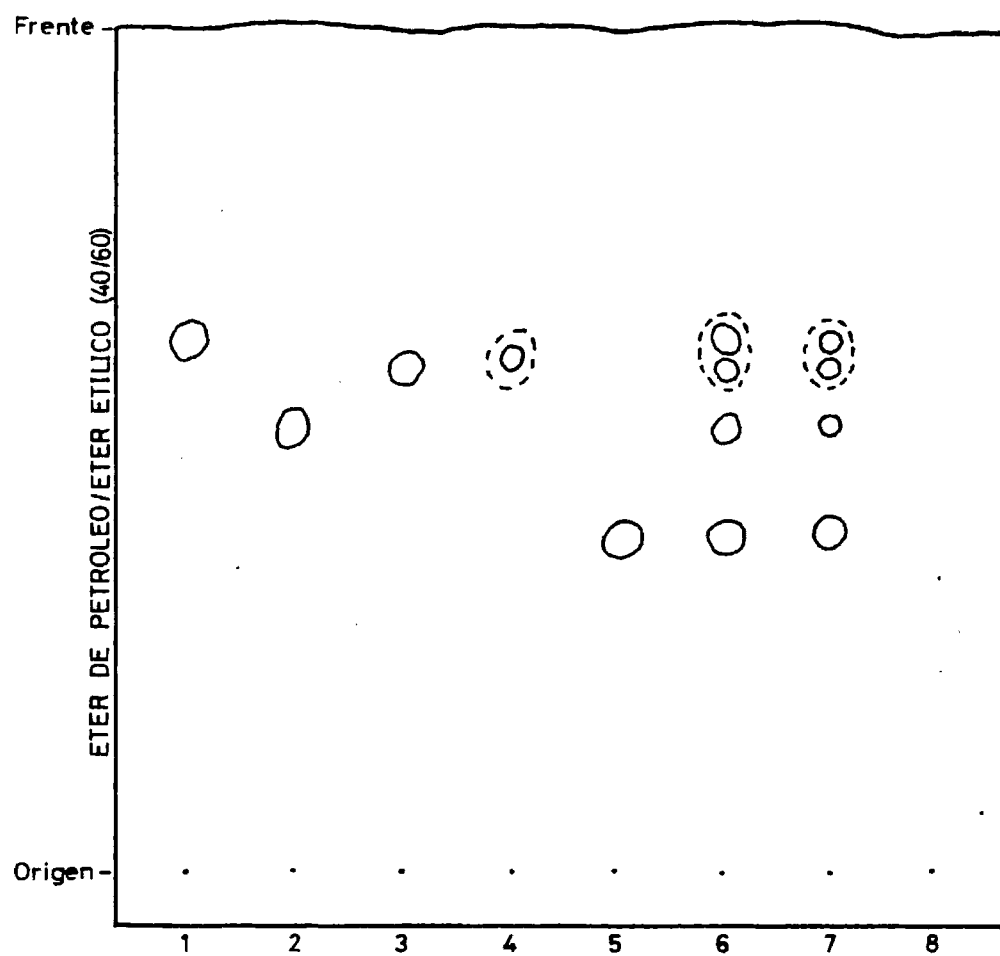


FIGURA 14: CROMATOGRAMA EN CAPA FINA DE PATRONES DE DES-trans (1), DES-cis (2), DIENESTROL (3), HEXESTROL (4), ESTRADIOL (5), DE UNA MEZCLA, A PARTES IGUALES, DE LOS MISMOS (6) Y DE LOS EXTRACTOS PROCEDENTES DE MUESTRAS DE CARNE A LA QUE SE LE AÑADIO UNA MEZCLA, A PARTES IGUALES, DE CADA UNO DE LOS PATRONES (7) Y DE CARNE EXENTA DE ESTROGENOS (8).

ellos, de acuerdo con la metodología de identificación descrita en III.2.2.2. La cromatografía del extracto obtenido a partir de la muestra control no reveló la presencia de estrógeno alguno. Quiere esto decir que el método utilizado fue altamente eficaz. El tamaño de las manchas que muestra la figura 14 corresponde a $1,25 \mu\text{g}$. de cada estrógeno.

Ni en los extractos obtenidos del hígado de los 24 animales utilizados en este estudio, ni en los de la musculatura cervical inferior se pudo detectar indicio alguno de estrógenos. Si bien el procedimiento de extracción es altamente eficaz (Smith y Mc Neil, 1972), el método cromatográfico utilizado en este estudio permite detectar, según los autores (Ferrando y Renard, 1968) niveles de estrógenos sintéticos en torno a $1 \mu\text{g}$.

Dado que se cromatografiaron, en cada caso, $50 \mu\text{l}$. de un extracto procedente de 20 gramos, puede concluirse que los tejidos procedentes de los animales utilizados o no contenían estrógenos sintéticos o en caso contrario sus niveles no superaban $1 \mu\text{g/g}$. de muestra.

Cantoni y Dragoni (1975) señalan que de todos los métodos propuestos la cromatografía en capa fina es la más conveniente dada la facilidad de ejecución y su gran sensibilidad. Ha sido empleada con éxito, entre otros por Ferrando y Renard (1968); Heffter y col, (1972); Canuti y col., (1972); Waldschmidt (1972); Valette y Ferrando (1973). Todos estos investigadores, tanto con fines experimentales como con fines de control de matadero, han comprobado la validez del método para concentraciones iguales o mayores a $1 \mu\text{g/g}$. de muestra.

El no detectar estrógenos en las muestras de tejido que hemos utilizado, por lo tanto y según se ha indicado debe atribuirse a que tales sustancias no se incorporan ordinariamente al pienso de los anima-

les, entre otras razones por que su precio de costo es superior al de los antitiroideos y además su manejo o mezcla con aquel exige una pericia o capacitación de la que carecen los ganaderos en España.

CAPITULO IV.

GLUCONO- δ -LACTONA, PROTEINAS DE SOJA, ALMIDON Y NITRITOS.

CAPITULO IV.

GLUCONO- δ -LACTONA, PROTEINAS DE SOJA, ALMIDON Y NITRITOS.

IV.1. INTRODUCCION.

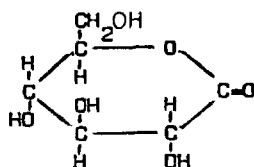
IV.1.1. Glucono- δ -lactona.

La glucono- δ -lactona (G δ L) es un aditivo cárnico usado principalmente en la preparación de algunos tipos de embutidos cuya maduración acelera aparentemente provocando una acidificación rápida de la - pasta o bodrio, aumentando su compactividad y dando así la impresión de una maduración prolongada (Lucisano y Splendiani, 1971).

Desde el punto de vista químico la G δ L es un éster interno del ácido glucónico y se obtiene de éste por pérdida de una molécula de agua. El ácido glucónico a su vez está relacionado constitucionalmente con la glucosa de la que deriva. Está perfectamente comprobado que ni el ácido glucónico, ni la G δ L tienen carácter tóxico.

La G δ L se suele presentar en forma de polvo cristalino, inodoro, soluble en agua y de sabor ligeramente dulce.

Su fórmula molecular es C₆H₁₀O₆ y su estructura química anillada o cíclica la siguiente:



La G δ L cristaliza rápidamente en la solución acuosa saturada. En agua se transforma rápidamente en ácido glucónico y su solución acuosa al 10% tiene un pH = 2,7; por este motivo ha sido propuesta como -

agente acidificante en la preparación de ciertos embutidos.

Es soluble a 20° C. en agua (59 g/100 ml.) y en el alcohol (1g/100 g). Es insoluble en éter. Su temperatura de fusión es de 153°C., y su poder rotatorio específico es $(\alpha)_D^{20} + 61,7^\circ$. Su peso molecular es 178,14.

El grado de hidrólisis de la glucono- δ -lactona en soluciones acuosas es en función del pH de las últimas, de su temperatura y del tiempo.

IV.1.1.1. Obtención de glucono- δ -lactona.

La glucono- δ -lactona se obtiene por oxidación biológica o electrolítica de la glucosa.

a) Oxidación biológica de la glucosa.

La conversión de la glucosa en ácido glucónico es una simple oxidación del grupo aldehído del azúcar a un grupo carboxilo. Esta transformación la pueden realizar varios microorganismos. El primero en detectarla en cultivos de Acetobacter aceti fué Boutroux en 1887, sin embargo, hoy día la producción industrial de este ácido se lleva a cabo con microorganismos de los géneros Aspergillus y Pseudomonas. El enzima que cataliza la oxidación de la glucosa es una oxidasa (glucosa-oxidasa) que transforma la glucosa en gluconolactona. El ácido glucónico se origina también por hidrólisis de la gluconolactona, mediante un proceso enzimático o no. El enzima requerido para la hidrólisis es una glucónolactonasa. Dado que no ha sido demostrada la presencia de este enzima en Aspergillus y Pseudomonas se le ha considerado como no enzimático.- El subproducto de la reacción, peróxido de hidrógeno, es descompuesto por la catalasa presente en la mayoría de las células vivas a agua y

oxígeno libre. El agua oxigenada es tóxica para las células que son incapaces de descomponerla.

Todo el mecanismo de la reacción puede ser descrito así:

1) Crecimiento celular.



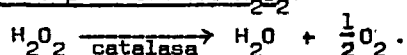
2) Oxidación de la glucosa.



3) Hidrólisis de la gluconolactona.

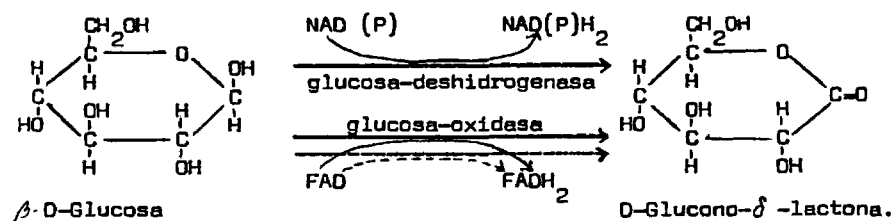


4) Descomposición del H_2O_2 .



En los estudios realizados por Rai y Constantinides (1973) se encontró que la cantidad de glucosa consumida para el crecimiento celular es muy pequeña comparada con la requerida para la formación de lactona.

Esta transformación de la glucosa también tiene lugar en los animales superiores, donde la oxidación puede ser catalizada por una glucosa-oxidasa o por una glucosa deshidrogenasa.



----- en los microorganismos.

———— en los animales superiores.

b) Oxidación electrolítica de la glucosa.

A nivel de laboratorio se puede preparar glucono- δ -lactona por oxidación de la glucosa con agua de bromo (Merck, 1968).

IV.1.1.2. Aplicaciones de la glucono- δ -lactona.

Debido a sus propiedades, la G δ L ha sido extensamente utilizada en la industria de la alimentación. Para las levaduras se ha empleado como acidulante, lo que se ha traducido en una menor producción de dióxido de carbono a bajas temperaturas y en una evolución más lenta de dicho gas, tanto con el transcurso del tiempo, como al aumentar la temperatura. Debido a esta propiedad, se ha utilizado con resultados satisfactorios, en la producción de pan, galletas y productos de pastelería.

En la fabricación de budines instantáneos, la G δ L, debido a su bajo índice de hidrólisis retrasa o prolonga la formación de aquéllos, con lo cual se obtienen mejores resultados en la formación de geles de ácido algínico, que cuando se emplean directamente ácidos.

La G δ L se ha usado también como coagulante en los productos lácteos y como agente para rebajar el pH de los productos lácteos y cárnicos. En este trabajo nos hemos ocupado principalmente del uso de la G δ L en los productos cárnicos.

IV.1.1.3. Empleo en la elaboración de embutidos.

La G δ L se ha usado tanto en la elaboración de embutidos crudos madurados, secos o semisecos, tales como los chorizos, salchichones y salamis, como en la de embutidos de procesado rápido, como las salchichas tipo "Frankfurt" (Sair y Henry, 1967).

Durante la elaboración normal de los embutidos desecados, és-

tos se mantienen en salas de maduración para que tenga lugar el crecimiento de algunas bacterias lácticas (principalmente Lactobacillus), cuyo papel más importante es la formación de ácido láctico mediante la fermentación de los azúcares presentes, lo que acarrea una acidificación del medio, destinada a inhibir el crecimiento de otros microorganismos perjudiciales, como los proteolíticos. El ácido láctico a su vez interviene en el sabor característico de los embutidos madurados y es el responsable de la reducción del pH de la carne a valores próximos al punto isoeléctrico de las proteínas cárnicas. Cuanto más se aproxima el pH al punto isoeléctrico de las proteínas tanto menor es la capacidad de retención de agua de éstas y, en consecuencia el agua se eliminará con mayor facilidad del embutido en las salas de maduración. Durante la desecación los embutidos pierden del 30 al 40% de su peso inicial.

Por otra parte, durante la maduración también se desarrollan diversas especies del género Micrococcus, cuya función es la reducir los nitratos a nitritos, que reaccionando con la mioglobina originan óxido nítrico mioglobina que es la responsable del color final que presentan los embutidos. En el caso de los chorizos y longanizas rojas, el pimentón contribuye igualmente a darles su color rojo característico.

Como en la fabricación de estos embutidos las primeras fases de maduración, tienen una importancia decisiva, especialmente en lo que se refiere a disminución del pH, se ha tratado de acelerar el proceso normal de maduración, facilitando la acidificación de la masa y el desarrollo de color, mediante la adición de una serie de aditivos, entre los que cabe destacar el nitrito sódico, el eritorbato sódico, el ácido cítrico y la GJ L. (Fox y col., 1967; Monagle y col., 1974).

Se ha empleado la GJ L por ser un aditivo eficaz que disminu-

ye de una manera rápida y equilibrada el pH de los embutidos, reduciendo de este modo la duración del periodo de maduración de los mismos (desde aproximadamente 60 hasta unos 10-15 días).

Cuando se añade a la pasta de los embutidos, una parte se transforma en ácido glucónico, al reaccionar con el agua que existe en dicha pasta, hasta que se establece un estado de equilibrio entre dicho ácido, la GóL y la γ -lactona. La formación de este ácido es más rápida a temperaturas altas (por ejemplo, en las cámaras de maduración) que cuando son relativamente bajas, como ocurre en la pasta de los embutidos poco después de haber actuado la cortadora centrífuga.

Normalmente se alcanza el equilibrio unas 6-12 horas después de la adición de GóL a la carne picada; el pH de la masa llega a 4,8-5,3.

Pfeil y Liepe (1974), recomiendan una caída inicial rápida - del pH para aproximarse al punto isoeléctrico de las proteínas, seguida de un descenso más lento de aquél y posteriormente de una subida final del pH hasta el punto isoeléctrico de las proteínas cárnicas, con el fin de evitar una gran pérdida de peso en el producto final.

La GóL además de ocasionar una acidificación rápida que impide el crecimiento de los microorganismos putridógenos, ayuda a que el embutido presente una coloración, firmeza y aroma adecuados permitiendo alcanzar más rápidamente la fase final (Kotter y col., 1968-69), aunque parece ser que cuando el producto se almacena durante 6 meses disminuye la calidad típica del producto original (Krylova y col., 1970).

La GóL se suele utilizar conjuntamente con una sal nitrosa (principalmente NaNO_2) para favorecer el desarrollo y estabilidad del color y mejorar el sabor.

El uso simultáneo de GóL y cantidades reducidas de NaNO_2 da como resultado una concentración significativamente más baja de nitrito residual en el producto final (Gerhardt y Haller, 1973). Esta reducción de la concentración de nitrito residual ejerce a su vez un efecto favorable sobre el sabor.

Las cantidades óptimas de GóL para la elaboración de embutidos se estiman entre el 0,3-0,8%.

A concentraciones superiores a las citadas, la GóL puede ocasionar cambios en la grasa, como el aumento del índice del ácido tiobarbitúrico (TBA), presentando las muestras una débil rancidez (Coretti, - 1971), así como también a cambios en el color y a una disminución significativa en la cantidad de humedad de los embutidos (Pate y col., 1971).

Si las concentraciones son excesivas, la GóL ejerce un efecto desfavorable sobre las características estructurales de la emulsión o pasta de los embutidos y del producto final (Duda y col., 1976).

En los embutidos procesados rápidamente, como las salchichas tipo "Frankfurt" se añade a la emulsión GóL para favorecer el desarrollo del curado. Tales emulsiones deben procesarse rápidamente para que no se produzca demasiado ácido glucónico que determinaría la rotura de la emulsión antes de que las proteínas coagulasen por la acción del calor (Price y Schweigert, 1976).

Según Monagle y col., (1974), la presencia de GóL no tiene ningún efecto sobre el color final de estos productos aunque la coloración máxima se desarrolle más rápidamente en presencia que en ausencia de este aditivo.

El empleo como aditivo de la GóL por la legislación alimentaria italiana (Schiavello y col, 1975) y por la francesa es considerado

como fraude, dado que la maduración del producto cárnico no cursa como en circunstancias normales. Por el contrario, la legislación española - permite el empleo de este aditivo en salchichones y chorizos, a dosis que no superen los 500 mg/Kg. de peso del producto terminado cuya humedad sea del 45%. Las disposiciones legales estadounidenses y las de - Alemania Federal autorizan su empleo en los embutidos; también en Suiza está autorizado, aunque con ciertas limitaciones (Lucisano y Splendiani, 1971).

IV.1.1.4. Métodos analíticos.

Diversos investigadores han intentado poner de manifiesto la Gδ L en los embutidos, entre ellos citaremos a Niemoller (1966) que utilizó la cromatografía en capa fina sobre gel de sílice adicionando ácido bórico 0,10N. La Gδ L se revela con una solución de metaperyodato sódico y bencidina.

Günther (1967) investiga la Gδ L con espectroscopía de infrarrojos, eluyendo la mancha obtenida por vía cromatográfica, secándola y haciendo una pasta con un haluro metálico (KBr).

Hamm y Schneider (1968) desarrollaron un método polarimétrico para la determinación de la Gδ L en productos cárnicos basado en que el ácido glucónico, resultante de la conversión de la Gδ L, forma un complejo ópticamente activo con el molíbdico. Los efectos interfirientes de los azúcares reductores (glucosa, lactosa) y del ácido ascórbico pueden eliminarse fácilmente.

Por último, Bergmeyer (1963) y Gawehn (1967) usaron un método enzimático de gran sensibilidad pero enormemente complicado.

Para nuestro análisis hemos empleado la cromatografía en capa fina según el método de Braun y Hieke (1966), cuyo principio es el si-

guiente:

La GóL en solución acuosa se transforma fácilmente en ácido glucónico. Esta transformación, bastante lenta, alcanza el equilibrio después de 6 a 12 horas a la temperatura ordinaria (10-20°C.). La reacción es reversible y por neutralización de la función ácida, llega a ser completa.

El ácido glucónico se separa de los azúcares que puedan existir en los productos a analizar por cromatografía en capa fina. Se oxida a continuación tratándolo con una pulverización de metaperyodato sódico que conduce a la formación, entre otros derivados, de aldehído fórmico que es revelado con bencidina.

Los azúcares y los ácidos orgánicos (láctico, cítrico y acético) no producen en estas mismas condiciones aldehído fórmico. Sólo el ácido ascórbico da reacciones similares pero no tiene interés en la fabricación de embutidos madurados secos y semisecos y además las dosis a que se emplea son muy pequeñas por lo que no interfiere en la estimación del ácido glucónico.

Este método ha sido recomendado y usado con mucho éxito por varios autores, entre los que citaremos a Couedor y col. (1970) y Lucisano y Splendiani (1971).

IV.1.2. Proteínas de soja.

La soja, Glycine max (Linn.) Merrill, es una planta nativa de Asia Oriental, cuyas semillas han servido durante siglos como parte importante de la dieta (Hackler et al., 1961). Su valor nutritivo ha sido muy apreciado a causa de su alto contenido en aceite y de su superioridad frente a otras proteínas vegetales, sin olvidar además que su costo es bajo en comparación con las proteínas animales (Pomeranz, 1961).

Los productos derivados de la soja presentan una serie de problemas relacionados con su sabor y estabilidad, con sus propiedades funcionales en los alimentos y con sus efectos fisiológicos.

Debido a su composición, la soja es una excelente fuente de dos componentes tan importantes para la elaboración de alimentos, como el aceite y la proteína. Los aceites de soja han llegado a ocupar un importante lugar en la industria alimentaria, mientras que las proteínas están siendo cada vez más utilizadas como sustituto parcial o total de las proteínas animales. Por ello revisaremos sus caracteres y propiedades más destacables.

IV.1.2.1. Estructura.

Las semillas de soja responden a las características típicas de las leguminosas, variando en tamaño, forma y color de acuerdo con la variedad de que se trate.

Dando un corte transversal se observan dos estructuras mayores -la corteza y el cotiledón- y dos menores -el hipocotileo y la plúmula.

La superficie del cotiledón está cubierta con una epidermis y el interior lleno de numerosas células alargadas en empalizada compuestas fundamentalmente de proteína y aceite. El aceite se localiza en unas pequeñas estructuras, llamadas esferosomas, que se sitúan entre las células en empalizada (Tombs, 1967).

Los constituyentes de mayor interés (aceite y proteína) suponen aproximadamente el 60% de la semilla, mientras que un tercio está constituido por hidratos de carbono, entre los que se incluye polisacáridos, estaquiosa, rafinosa y sacarosa (Kawamura, 1967).

También posee fosfátidos, esteroides, cenizas y otros constitu

yentes menores (Markley, 1950).

Existen excelentes revisiones sobre los distintos procesos de obtención de derivados de soja; entre ellas citaremos las siguientes: Willians, 1950; Burnett, 1951; Circle y Johnson, 1958; Norris, 1964 y Wolf y Cowan, 1971.

IV.1.2.2. Propiedades físicas y químicas.

La mayoría de las proteínas son sensibles a tratamientos físicos y químicos cuyos efectos sobre otros componentes alimenticios suelen ser pequeños o incluso nulos.

El calor húmedo y los valores extremos de pH son ejemplos de dos condiciones de procesado que pueden alterar mucho algunas propiedades físicas de las proteínas de soja, como solubilidad, peso molecular y viscosidad.

a) Solubilidad en función del pH.

La solubilidad es una importante propiedad física de las proteínas de la soja.

La mayoría de las proteínas de la soja son globulinas, pero también posee algunas albúminas.

La relación pH-solubilidad de las proteínas de soja es similar a la de la caseína ya que tienen el mismo punto isoelectrico (pH = 4,6). En consecuencia, las proteínas "aisladas" de soja pueden sustituirse a menudo por caseína y caseinatos en los productos alimenticios, sin embargo, requieren una evaluación cuidadosa porque estas dos proteínas también difieren en muchos aspectos.

Las globulinas de soja pueden modificarse bajo la acción de la pepsina haciéndose solubles en la región isoelectrica. Las proteínas

así obtenidas son fácilmente hidrolizables y tienen unos pesos moleculares más bajos que las globulinas no modificadas. Los hidrolizados pepsínicos se usan principalmente por sus propiedades espumantes y se incorporan a los alimentos ligeramente ácidos, tales como los caramelos, en los que las proteínas sin modificar son muy poco solubles (Burnett, 1951).

Todavía no existe una nomenclatura generalmente admitida para clasificar las proteínas de soja, a pesar de que hoy día se están realizando una serie de investigaciones sobre la identificación de sus distintos tipos de proteínas y de sus estructuras (Seal y col., 1978).

Smith y Rackis (1957), Kelley y Pressey (1966), Koshiyama - (1968, 1970), Catsimpoolas y Meyer (1970), han contribuido con sus excelentes trabajos al conocimiento de las propiedades físicas y químicas de las distintas fracciones globulínicas de la soja.

b) Desnaturalización.

Las proteínas de soja son sensibles a la mayoría de las condiciones que originan la desnaturalización de las proteínas. De fundamental interés para los tecnólogos de alimentos son los efectos del calor húmedo y de los valores extremos de pH.

b.1. Desnaturalización por el calor.

Ya que la mayoría de los alimentos son calentados durante una o más etapas de su elaboración, esta forma de desnaturalización es la más frecuentemente encontrada, pero también la menos conocida.

El efecto mejor conocido del calor húmedo sobre la proteína es su insolubilización en agua o en soluciones salinas. Puesto que las proteínas de soja se insolubilizan por el calor húmedo, la estimación

de su solubilidad ha sido propuesta como medida de la intensidad del tratamiento térmico dado a los productos de soja.

Para determinar la extensión de la desnaturalización se desarrolló un método de hidrólisis enzimática, basado en la resistencia, - bien conocida, de muchas proteínas nativas a la digestión por enzimas proteolíticos y en la facilidad con que se hidrolizan después de su desnaturalización.

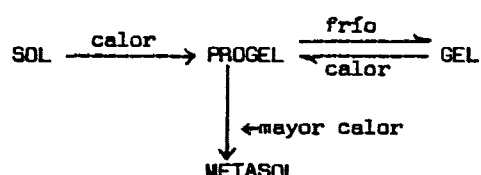
El calentamiento de proteinatos de soja comercial de una concentración mayor del 7% causa primero un aumento de la viscosidad y luego gelificación. El calentamiento a 70-100°C. durante 10 a 30 minutos es suficiente para conseguir un efecto gelificante; los geles se rompen a 125°C. La cisteína y el sulfito sódico que actúan como agentes solubilizantes de las proteínas "aisladas" disminuyen las viscosidades de sus dispersiones, tanto calentadas como sin calentar e inhiben su gelificación (Circle y col., 1964). El bisulfito sódico y el mercaptoetanol inhiben también la gelificación (Aoki y Sakurai, 1968).

Los puentes disulfuro juegan un papel importante en la gelificación térmica.

Catsimpoolas y Meyer (1970), han propuesto una transición del estado de sol al de progel y gel en la gelificación térmica de las globulinas precipitadas en medio ácido.

Mediante calentamiento el sol es irreversiblemente convertido en progel y éste por enfriamiento en gel. El gel es a su vez reversible mente convertido en progel por recalentamiento. Durante la conversión del sol en progel, la viscosidad aumenta a medida que lo hace la temperatura hasta llegar a un máximo. A temperaturas más altas la viscosidad disminuye como resultado de la conversión irreversible del progel en me

tasol que no gelifica en frío. Esta transición se recoge en el esquema siguiente de Wolf y Cowan (1971):



Los agentes que rompen los puentes disulfuro determinan la conversión del progel en metasol.

b.2. Desnaturalización por ácidos o álcalis.

Los pHs extremos desnaturalizan las globulinas de la soja. Los pHs altos rompen las estructuras de las subunidades de las globulinas 7S, 11S y de otros componentes, pero este proceso es irreversible cuando el pH de las proteínas es ajustado a su neutralidad. A pHs. muy bajos estas globulinas sufren también cambios irreversibles, indicativos de una disociación de las estructuras cuaternarias en subunidades.

En contraste con la sensibilidad a los ácidos de la globulina 11S, la 7S es más estable. Sin embargo, tienen lugar cambios irreversibles si la globulina 7S se mantiene durante mucho tiempo a pH = 2 o si se disuelve en ácidos más fuertes (por ejemplo, ClH 0,1N) (Koshiyama, 1968).

c) Aminoácidos de las proteínas de soja.

Una importante cualidad de las proteínas de soja es su composición en aminoácidos de la que dependen sus propiedades físicas, químicas y nutricionales. La tabla IV muestra los aminoácidos esenciales y

TABLA IV.

Composición en aminoácidos de los distintos tipos de proteínas de soja (valores expresados en gramos de aminoácidos por 16 gramos).

Aminoácido	Harina	Concentrado proteico.	Proteína aislada.
Esencial			
Lisina	6,9	6,3	6,1
Metionina	1,6	1,4	1,1
Cistina	1,6	1,6	1,0
Triptófano	1,3	1,5	1,4
Treonina	4,3	4,2	3,7
Isoleucina	5,1	4,8	4,9
Leucina	7,7	7,8	7,7
Fenilalanina	5,0	5,2	5,4
Valina	5,4	4,9	4,8
No esencial			
Arginina	8,4	7,5	7,8
Histidina	2,6	2,7	2,5
Tirosina	3,9	3,9	3,7
Serina	5,6	5,7	5,5
Ac. glutámico	21,0	19,8	20,5
Ac. aspártico	12,0	12,0	11,9
Glicina	4,5	4,4	4,0
Alanina	4,5	4,4	3,9
Prolina	6,3	5,2	5,3
Amoniaco	2,1	1,9	2,0

no esenciales de las proteínas de la harina, de los concentrados proteicos y de las proteínas "aisladas" de soja.

Deben destacarse sus contenidos en lisina y metionina. La gran cantidad de lisina de las proteínas de soja las convierte en suplementos útiles para complementar las proteínas de cereales que son bajas en este aminoácido. La metionina es el primer aminoácido limitante de las proteínas de soja, de ahí que su bajo contenido deba ser tenido en cuenta cuando las proteínas sean usadas con propósitos nutricionales. Aunque el contenido en cistina es bajo, este aminoácido contribuye a las propiedades gelificantes de las proteínas "aisladas" de soja.

IV.1.2.3. Formas de proteínas de soja.

Atendiendo a la forma en que las proteínas de soja se usan en los alimentos pueden establecerse dos grupos: soja entera y productos de proteína de soja procesados.

a) Soja entera.

Se suele usar en preparados alimenticios de niños lactantes - alérgicos a la leche de vaca y en la alimentación vegetariana (por ejemplo, soja en salsa de tomate enlatada).

Donde más se utilizan las sojas enteras es en la preparación de alimentos orientales como "tofu", "miso", "tempeh", etc.

b) Productos de proteínas de soja procesados.

Estos productos se dividen en tres categorías basándose en su contenido proteico: harinas y gránulos de soja; "concentrados proteicos" y proteínas "aisladas". A partir de ellos se han elaborado una gran variedad de productos de proteína de soja que actualmente se venden en

los mercados, como por ejemplo las proteínas texturizadas.

b.1. Harinas y gránulos de soja.

Las harinas y gránulos tienen un contenido proteico que oscila entre el 40 y el 50%. La mayoría se elaboran a partir de semillas descortezadas, tienen una composición química similar y difieren sólo en su contenido graso, en el tratamiento térmico recibido y en el tamaño de partícula. Los gránulos se obtienen mediante una trituration y tamizado groseros, mientras que las harinas se preparan de una forma más fina.

El término de harina, aplicado a la soja, se refiere por lo tanto solamente al tamaño de partícula; las harinas de las proteínas de soja no tienen las propiedades viscoelásticas características de las harinas de trigo.

Se han preparado muchas variedades de estos productos para mejorar las propiedades físicas y funcionales de los diferentes alimentos a los que se incorpora la proteína de soja.

Las harinas y los gránulos son los productos menos refinados de la soja y, por lo tanto, los de más bajo contenido proteico.

b.2. "Concentrados proteicos" de soja.

Los "concentrados proteicos" tienen un contenido proteico mayor (70%) y se obtienen a partir de "copos" de soja desengrasados, o de las harinas, mediante eliminación de los azúcares solubles en agua, de las cenizas y de otros componentes de bajo peso molecular.

Existen tres procedimientos usados comercialmente para preparar "concentrados", que difieren entre sí en los métodos seguidos para la insolubilización de las proteínas mayores de la soja; sus componen-

tes de bajo peso molecular se eliminan.

El primer procedimiento extrae los constituyentes no proteicos con alcohol acuoso (Mustakas y col., 1962); en el segundo procedimiento las proteínas ameyores se insolubilizan extrayéndolas con ácido diluido a pH=4,5 (Moshy, 1964) y en el tercero las proteínas son insolubilizadas mediante desnaturalización por calor húmedo, eliminándose con agua los constituyentes de bajo peso molecular (McAnelly, 1964).

A las personas interesadas en los procedimientos de preparación de concentrados proteicos les recomendamos la lectura de Wolf - (1969).

Las composiciones de estos tres tipos de concentrados son muy similares a pesar de los diferentes procedimientos usados, pero sus propiedades físicas son diferentes (Meyer, 1967).

b.3. Proteínas "aisladas" de soja.

Las formas más refinadas de la soja son las proteínas "aisladas" que se obtienen eliminando los polisacáridos insolubles en agua, los azúcares solubles y otros componentes menores.

La harina o los "copos" de soja desengrasados, se someten a la extracción con un álcali diluido (pH=7-9) a 50-55°C. El residuo insoluble (polisacáridos insolubles más residuos proteicos) es eliminado mediante tamizado, filtración y centrifugación, y el extracto obtenido (mezclas de proteínas e hidratos de carbono solubles) se somete a una precipitación isoelectrica para eliminar así a los hidratos de carbono solubles. Finalmente el material obtenido se neutraliza y se seca en forma de polvo seco que constituye la proteína "aislada". Las proteínas "aisladas" por su dispersibilidad en agua y por ser más fáciles de incorporar a los productos alimenticios son generalmente preferidas

por la industria alimentaria.

El producto final así obtenido presenta un 92-95% de proteína, un 2-3,8% de cenizas, de 3,7-7,6% de humedad, y trazas de aceite y fibra (Meyer, loc. cit.).

Las proteínas "aisladas" suelen ser más pobres en lisina y en los primeros aminoácidos limitantes, metionina y cistina, que los "concentrados" proteicos y que las harinas de soja.

IV.1.2.4. Propiedades funcionales.

Hasta el empleo reciente de la proteína texturizada de soja, la razón fundamental por la que se adicionaba a los alimentos no era su valor nutritivo, sino sus excelentes propiedades funcionales, sobre las que se han publicado recientemente una serie de revisiones (Wolf, 1969-1970; Johnson, 1970; Rakosky, 1970).

A la proteína de soja se le atribuyen muchas propiedades funcionales, a pesar de que una revisión crítica de estas propiedades es bastante difícil, debido a que son muy pocos los datos confirmados y a menudo algunos resultan en su totalidad defectuosos. Además se carece de pruebas normalizadas apropiadas para medir dichas propiedades. Aunque corrientemente ciertas propiedades funcionales se atribuyen a las proteínas de soja, no debe olvidarse que otros componentes de ésta, en las formas más imperfectas, pueden influenciar también los efectos observados.

a) Emulsificación.

Las proteínas de soja juegan probablemente dos papeles en la emulsificación: ayudar a la formación de las emulsiones de aceite en agua y favorecer su estabilización. Ya que las proteínas poseen activi-

dad superficial, se sitúan en las interfases aceite-agua y bajan la tensión superficial, haciendo de este modo más fácil la formación de emulsiones.

La estabilidad de la emulsión es importante ya que el éxito de un emulsionante depende de su habilidad para mantener la emulsión durante las distintas fases del proceso.

Las harinas de soja, "concentrados" proteicos y proteínas "aisladas", son muy usados como emulsionantes en los productos cárnicos - (Pearson y col., 1965). Los resultados de pruebas de emulsificación con un sistema modelo de soja, aceite y agua, sugirieron que las proteínas "aisladas" serían unos emulsionantes pobres en los productos cárnicos picados. Sin embargo, durante la elaboración de embutidos se observó - que dos proteínas sódicas "aisladas" aventajaban al caseinato sódico, mientras que un "concentrado" proteico de soja, con una baja solubilidad proteica, era para este propósito un emulsionante pobre.

b) Retención de grasa.

En lo que concierne a retención de grasa en los alimentos, las proteínas de soja se utilizan con dos propósitos diferentes. Mejoran la retención o ligazón de la grasa en las carnes picadas y de este modo disminuyen las pérdidas por cocción y ayudan a mantener la estabilidad dimensional del producto termoprocesado. Son muy pocos los datos disponibles sobre la retención de grasa por los productos de soja, que es máxima a los 15-20 minutos de adicionados y que varía con el tamaño de su partícula; en general los productos de partículas pequeñas, retienen o absorben más aceite que las de mayor tamaño.

El mecanismo de retención o ligazón de las grasas no ha sido bien explicado. En un producto de carne picada, como las salchichas ti-

po "Frankfurt", la ligazón de la grasa parece implicar la formación y estabilización de una emulsión, además de la formación de una matriz gelificada que impide la migración de la grasa a la superficie (Rock y col., 1966). Por lo tanto la retención de grasa puede constituir simplemente otro aspecto de la emulsificación.

c) Absorción de agua.

Las proteínas de soja contienen numerosas cadenas polares laterales a todo lo largo de su cadena polipeptídica, convirtiendo a las proteínas en hidrofílicas y, en consecuencia, absorben agua que tienden a retenerla en los productos acabados. Algunos de los puntos polares de las proteínas de soja, tales como los grupos carboxilo y amino son ionizables, por lo tanto la polaridad puede cambiarse modificando el pH y en consecuencia se pueden alterar las propiedades de absorción de agua de la harina de soja (McAnelly, 1964).

La retención de agua por los geles de proteína de soja en función del pH se parece a la curva de pH-solubilidad de la proteína de soja; la retención de agua es mínima a pH 4,5 y aumenta rápidamente a medida que el pH se separa en sentido ascendente o descendente de esta región (Aoki, 1965).

Las capacidades de absorción de agua son importantes en productos para hornear.

El tanto por ciento de absorción de agua de los productos de soja depende del tamaño de la partícula y de su distribución. Las partículas finas no son de recomendar porque absorben agua muy rápidamente produciendo una textura demasiado blanda en el producto.

La absorción de agua es también importante para la aparición de textura típica de los análogos de carne preparados por extrusión a

partir de la harina de soja. La capacidad de retención de agua de estos productos oscila entre 2,4 y 3,4 veces su peso seco. La hidratación es necesaria para que la textura crujiente de los productos secos se convierta durante la masticación en una blanda y fibrosa como la de la carne.

d) Textura.

El poder conferir textura a una variedad de alimentos (tradicionales y nuevos) es una de las más importantes propiedades de las proteínas de soja.

Las proteínas de soja proporcionan textura de muy diversas maneras: una de las más sencillas, el espesamiento de productos tales como sopas y salsas, se consigue mediante la adición de harina de soja.

Las propiedades gelificantes de las proteínas de soja contribuyen a dar textura a los productos de carne picada tales como salchichas tipo "Frankfurt". La estructura proporciona una matriz que retiene la humedad y la grasa y da "cuerpo" a los productos.

Para obtener la estructura de gel no se necesita carne; se ha descrito un procedimiento (Frank y Circle, 1959) para elaborar análogos de embutidos de los tipos "Frankfurt" y mortadela en los que toda su proteína está constituida por proteína "aislada" de soja.

También se ha estudiado la influencia que ejerce sobre la gelificación la adición de sales, lípidos y polisacáridos corrientemente empleados en los alimentos.

Para impartir una textura como la de la carne a las harinas de soja y a las proteínas "aisladas", se han recomendado varios métodos (Ziemba, 1969; Anon., 1970).

Entre ellos tenemos el de agitación-coagulación (Rusoff y col.

1962) que no ha sido comercializado; el de extrusión de harina de soja perfectamente descrito por Ziemba (1969) y un método complejo y muy caro que es el de obtención de fibras de proteína a partir de las proteínas "aisladas" (Westeen y Kuramoto, 1964; Ziemba, 1969).

e) Formación de masa.

Se trata de una propiedad muy importante en la industria panadera y de escaso interés en la tecnología de la carne por lo que no le prestamos atención, como tampoco a su papel como blanqueador, de gran interés también en la industria panadera, ni a la capacidad que tienen de formar espuma por agitación (aireación). Estas propiedades han sido estudiadas, entre otros, por Eldridge y col. (1963), McAnelly (1964) y Kies et al., (1969).

f) Adhesión, cohesión y elasticidad.

Estas propiedades funcionales han sido atribuidas a las proteínas de soja de una gran variedad de alimentos y se basan sobre todo en observaciones subjetivas más que en medidas objetivas.

Las propiedades adhesivas de las proteínas "aisladas" se utilizan para mantener unidas las porciones trituradas de carne de pollo y de pavo amasadas, mezcladas y ligeramente prensadas, para formar hamburguesas, rollos, etc. La elasticidad y cohesividad se aprecia claramente en los geles de las salchichas tipo "Frankfurt" y mortadelas.

g) Formación de película.

La capacidad peliculógena de las proteínas de soja es una propiedad deseable en salchichas tipo "Frankfurt" y en mortadelas. Cuando se esterilizan las masas de soja-agua se forma una película en su super

ficie. Esta película superficial actúa como una barrera para el agua y los solventes acuosos y puede romperse por trituración o corte (McAnally, 1964).

Cuando la carne se reboza o se mezcla con una combinación de proteína "aislada" de soja (o de "concentrado" proteico) y de clara de huevo, las proteínas recubren y facilitan la desecación de sus fibras.

La cubierta proteica retarda la pérdida de sabor de las porciones de carne desecadas, ayuda a su rehidratación y da una textura deseable al producto rehidratado (Coleman y Creswick, 1966).

IV.1.2.5. Propiedades nutricionales.

Como demostraron Osborne y Mendel (1917), las ratas alimentadas con harina de soja cruda o tratada térmicamente por calor seco presentaban un deficiente desarrollo; sin embargo, cuando la harina se sometía a un calentamiento por calor húmedo durante tres horas permitía un desarrollo normal de estos animales.

El calor húmedo todavía se utiliza para mejorar la calidad nutritiva de los productos de soja destinados a alimentos humanos y piensos. No obstante, todavía se desconoce el mecanismo de este efecto mejorante y lo escrito sobre este tema es a menudo confuso y contradictorio. Mickelsen y Yang (1966) y Liener y Kakade (1969) han revisado los principales trabajos publicados en los últimos cincuenta años sobre este problema.

IV.1.2.6. Métodos para la detección y determinación de proteínas de soja en productos cárnicos.

Han sido muchos y diferentes los métodos de análisis de proteína de soja en productos cárnicos que han sido investigados hasta -

ahora. En general, se basan en las diferencias en propiedades físicas y químicas de las moléculas proteicas de la carne y de la soja, tales como movilidad electroforética, peso molecular y respuesta inmunoquímica.

Los mejores métodos son actualmente los siguientes:

A) Métodos serológicos.

Se basan en la precipitación serológica resultante de la reacción entre las proteínas de soja y un antisuero específicamente preparado (Kruger y Grossklaus, 1971). Los inconvenientes de estos métodos - estriban en las dificultades que presenta la extracción de las proteínas de soja y en la falta de un antisuero comercial apropiado. Otro problema que puede presentarse es la reducción de la actividad antigénica durante los cambios de procesamiento de las proteínas de soja en comparación con las proteínas de soja originalmente usadas para preparar el antisuero (Guy y col., 1973).

B) Métodos histológicos.

Están basados en el contenido de hidratos de carbono del material examinado y pueden ser usados para estimar el contenido de soja. El aspecto microscópico que presentan las preparaciones de soja depende esencialmente del tratamiento de transformación a que han sido sometidas ya que su estructura natural es destruida. Uno de estos métodos comprende una oxidación controlada de los hidratos de carbono presentes en los productos proteicos vegetales y la posterior demostración de la presencia de los aldehídos resultantes. Este método permite distinguir entre los hidratos de carbono asociados a las proteínas de otras plantas y los de los granos de soja (Coomaraswamy y Flint, 1973).

C) Métodos electroforéticos.

Fueron los primeros en dar resultados satisfactorios y han sido los más estudiados por varios investigadores (Olsman y col., 1969; - Thorson y col., 1969; Freimuth y Krause, 1970; Fischer y Belitz, 1971; Hofmann y Penny, 1971; Parsons y Lawrie, 1972; Guy y col., 1973; Homayounfar, 1975; Lee y col., 1975). A pesar de todo, aún existen lagunas en nuestro conocimiento al respecto.

Estos métodos consisten, a grandes rasgos, en una disolución de las proteínas en un medio de extracción adecuado como la urea 8M o el dodecil sulfato sódico y la separación de las proteínas de soja de las proteínas cárnicas solubles mediante electroforesis de disco o en placa de gel de almidón o poliacrilamida.

La electroforesis de disco en gel de poliacrilamida es la más usada y ha sido la empleada para nuestro estudio.

IV.1.3. Almidón.

El almidón representa la mayor fuente de energía de la dieta del hombre. Es el hidrato de carbono de reserva más importante de los vegetales comestibles que lo almacenan en forma de gránulos en las semillas, frutos, tubérculos o raíces, dependiendo de la planta en cuestión.

En los granos de cereales, como arroz, trigo, maíz, etc., el almidón representa el 75% del grano.

La mayor parte del almidón se consume sin aislarlo de la planta que lo contiene, pero el almidón refinado, tanto natural como modificado, juega un importante papel en la elaboración de alimentos (Wurzburg, 1968).

IV.1.3.1. Estructura molecular.

El almidón está constituido por dos moléculas de polisacáridos, una lineal (amilosa) y la otra ramificada (amilopectina). Ambas son homoglicanos de D-glucosa. En el almidón natural, estas moléculas se encuentran estrechamente unidas formando gránulos microscópicos. Los gránulos generalmente contienen ambos tipos de moléculas, con cantidades de amilosa del orden del 15-30% del total. No obstante, existen variedades de cereales cuyas semillas contienen solamente amilopectina - (son las llamadas variedades "céreas"), mientras que otras variedades contienen un 85% de amilosa.

A) Aamilosa.

La amilosa está constituida por unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos $\alpha(1 \rightarrow 4)$. La unidad monomérica es el disacárido maltosa.

El peso molecular de la amilosa varía con su origen botánico y con el proceso de aislamiento seguido. Sus valores oscilan entre 1,1 millones y 1,9 millones de Daltons (Greenwood, 1956; Killion y Foster, 1960; Banks y col., 1973).

Con el yodo forma un compuesto de color azul brillante, lo que sirve de base para la determinación cualitativa del almidón.

B) Amilopectina.

La mayoría de los enlaces de las unidades de D-glucosa de la amilopectina son del tipo $\alpha(1 \rightarrow 4)$, como en la amilosa. Además, un 4-5% de las unidades de glucosa están unidas por enlaces $\alpha(1 \rightarrow 6)$ - dando origen a una estructura ramificada. El disacárido que forma el -

enlace ramificado es la isomaltosa.

Mediante procedimientos químicos se ha demostrado que la molécula de amilopectina presenta, aproximadamente cada 20-25 unidades de D-glucosa, una ramificación y que estas ramificaciones se unen a su vez a otras cadenas. Lee y col. (1968), demostraron que las moléculas de amilopectina no poseían una estructura simétricamente ordenada.

IV.1.3.2. Estructura granular.

En los tejidos vegetales el almidón se encuentra en forma de gránulos, que presentan aspectos distintos, según el tipo de planta en que se estudie. Estos gránulos permanecen esencialmente enteros durante la mayoría de los procesamientos usados para preparar el almidón que se utiliza como ingrediente alimenticio, y lo mismo ocurre en los procesos de elaboración de almidones modificados. La estructura del gránulo y los cambios que sufre durante la elaboración de ciertos productos alimenticios tienen un gran interés para el tecnólogo de alimentos.

Otros ingredientes alimenticios tienen importantes efectos sobre los cambios de los gránulos del almidón, los cuales a su vez, afectan a la textura y a la estabilidad del producto alimenticio final.

Las imágenes microscópicas de los gránulos de almidón, son características de cada especie botánica, lo que permite su identificación en los alimentos. Las características que diferencian estas imágenes son: tamaño, forma, uniformidad de los gránulos, localización del hilum, presencia o ausencia total o parcial de estriaciones alrededor del hilum y la birrefringencia.

En el gránulo existe una mezcla de moléculas lineales y ramificadas, distribuidas radialmente en capas concéntricas (Badenhuizen,

1959), que pueden unirse entre sí mediante puentes de hidrógeno formando micelas, responsables a su vez de la birrefringencia del gránulo.

Entre las capas concéntricas y entre las micelas existen espacios vacíos fácilmente accesibles al agua.

Además de hidratos de carbono en el gránulo existen en cantidades muy pequeñas otras sustancias.

IV.1.3.3. Propiedades principales.

A.- Gelatinización.

Bajo condiciones normales, las moléculas de almidón absorben una cantidad de humedad proporcional a la humedad relativa de la atmósfera; por ejemplo, las semillas de cereales tienen una humedad del 12-14%.

El agua fría puede penetrar entre los espacios de las micelas hasta alcanzar el 30% del peso total del gránulo; sin embargo el hinchamiento del gránulo sólo se puede observar al microscopio.

Antes de que la mezcla almidón-agua se caliente a temperaturas suficientemente altas para proporcionar la energía necesaria para romper los puentes de hidrógeno intermoleculares, el gránulo comienza a hincharse notablemente, lo que acarrea una pérdida de la orientación radial de sus micelas y de su birrefringencia. El calentamiento posterior origina una mayor pérdida de su estructura reticular, permitiendo así que penetre en el gránulo agrandándolo cierta cantidad de agua adicional. Sin embargo, las micelas permanecen en gran parte intactas y mantienen a los gránulos unidos en redes enormemente hinchadas, a menos que se sometan a temperaturas que sobrepasen los 100°C. o a una agitación lo suficientemente violenta como para producir la fragmentación de

los gránulos hinchados. Una agitación de tal intensidad raramente ocurre en el procesamiento de los alimentos. Sin tal agitación, las suspensiones acuosas de gránulos de almidón calentadas a temperaturas elevadas (esterilización) pueden ocasionar depresiones en los gránulos y luego su fragmentación gradual. Incluso cuando los gránulos hinchados de almidón no se fragmentan por la alta temperatura o agitación, algunas de las moléculas más pequeñas de amilosa pueden separarse y pasar al agua del medio. Por lo tanto, el engrudo resultante está constituido por grumos muy hinchados de moléculas de almidón suspendidas en una solución de almidón.

La temperatura a la que los gránulos de almidón se hinchan rápidamente y pierden su birrefringencia es llamada temperatura de gelatinización. Más propiamente debería de llamarse intervalo de temperatura de gelatinización, debido a que los gránulos particulares de cada muestra de almidón difieren entre sí, no solamente en tamaño y forma, sino también en la energía necesaria para dar lugar a su hinchamiento.

La temperatura de gelatinización permite la identificación de los almidones de diferentes fuentes.

Los valores de gelatinización no indican exactamente la temperatura a la que los diferentes almidones gelatinizan en los sistemas de alimentos, debido a la influencia que sobre ellos ejercen otros ingredientes de los alimentos.

B.- Cambios de viscosidad.

A medida que la temperatura de la suspensión de almidón supera a la de la gelatinización, los gránulos continúan hinchándose si disponen de agua suficiente. En algunos sistemas alimenticios, como por ejemplo en el pan, la pequeña cantidad de agua existente limita su hin-

chamiento ulterior. En los sistemas más diluidos, el hinchamiento adicional puede ser grande pero la viscosidad sólo aumenta notablemente - después de que los gránulos se hinchan lo suficiente como para confluir. En algunos casos, la fricción puede ser tan grande que los gránulos ahora frágiles se rompan en fragmentos, dando lugar a una disminución de la viscosidad.

C.- Formación del gel.

Cuando una mezcla densa de almidón se agita y enfria al mismo tiempo, su viscosidad generalmente aumenta. Si se mantiene en reposo antes o después del enfriamiento, hay una tendencia a que se formen puentes intermoleculares. Cuando sólo hay moléculas de amilopectinas como en los almidones "céreos", las ramificaciones evitan el grado de asociación requerido para la formación de gel, excepto cuando existen concentraciones muy altas de almidón (30% o más). Los almidones de raíces (féculas) forman gel más lentamente que los de cereales.

D.- Retrogradación.

La retrogradación puede ser considerada como la progresión normal de la firmeza de un gel de almidón. La velocidad y la intensidad de la retrogradación están influenciadas por la temperatura, tamaño, forma y concentración de las moléculas de almidón y por la presencia de otros ingredientes alimenticios. Parece que donde más rápidamente ocurre es a temperatura próximas a 0°C. Por esta razón, la tendencia de los almidones a la retrogradación se evalúa en los alimentos congelados, examinando sus pastas sometidas a diversos ciclos de congelación y descongelación.

Los almidones "céreos" no modificados, que no forman geles -

excepto a muy alta concentración, retrogradan bajo estas condiciones y también durante el almacenamiento en congelación (Hanson y col., 1951; Hanson y col., 1953).

La retrogradación de la amilopectina puede invertirse por calentamiento, en cambio, la amilosa retrogradada no puede ser revertida por los métodos de calentamiento ordinario.

E.- Formación de película.

A partir de la amilosa se originan películas fuertes y flexibles que poseen la propiedad poco corriente de ser hidrosolubles y comestibles.

Los alimentos pueden recubrirse con películas de amilosa para mejorar la retención de agua y disminuir la adhesividad superficial en las frutas deshidratadas.

F.- Efectos de otros ingredientes alimenticios.

La información sobre el comportamiento de los sistemas almidón-agua, aunque muy valiosa para los tecnólogos de alimentos, necesita ampliarse con el conocimiento de las interacciones del almidón con otros componentes de los sistemas alimenticios. Incluso los datos obtenidos - al adicionar un solo ingrediente a la mezcla almidón-agua deben utilizarse con gran cautela, si se intenta predecir el comportamiento de productos alimenticios más complejos. Estos efectos, así como la información acerca del papel del almidón en algunos alimentos específicos, han sido revisados con más detalle, entre otros, por Osman (1967), D'Appolonia y col. (1971), y Osman (1972).

F.1.- Azúcar.

Debido a su propio carácter hidrofílico, el azúcar compete -

con el almidón por el agua presente en la mezcla, por lo tanto, retarda el hinchamiento de los gránulos de almidón. A concentraciones de azúcar bajas, el retraso en el hinchamiento del almidón es escaso, y en algunos casos la viscosidad máxima aumenta ligeramente. El aumento de la viscosidad se produce porque las cantidades pequeñas de azúcar demoran aparentemente la fragmentación de los gránulos que se hincharon más rápidamente sin evitar la hinchazón de otros gránulos. Concentraciones mayores de azúcar bajan tanto la velocidad de hinchamiento como la viscosidad final; la fuerza del gel disminuye progresivamente a medida que aumenta la cantidad de azúcar adicionada. Además de la sacarosa, otros azúcares ejercen el mismo efecto cualitativo pero con diferente intensidad.

F.2.- pH.

La mayoría de los alimentos tienen valores de pH entre 4 y 7. Las variaciones en este orden producen solamente efectos menores sobre la velocidad de hinchamiento de los gránulos o sobre la viscosidad final. El aumento de la velocidad de hinchamiento observado en sistemas fuertemente alcalinos, raramente tiene más interés para el tecnólogo de alimentos que el meramente teórico; sin embargo, los efectos de los ácidos tiene una importancia extraordinaria en numerosos productos alimenticios, tales como salsas para ensaladas, rellenos de frutas, sopas de tomate, etc., etc.

El hinchamiento de los gránulos se acelera y su fragmentación aumenta con solo un desdoblamiento hidrolítico relativamente pequeño - del almidón, por lo que la viscosidad máxima obtenida se reduce apreciamente y durante el almacenamiento tiene lugar una rápida pérdida del

espesamiento de la mezcla.

En la práctica comercial la mejor forma de evitar este aclaramiento de las salsas para ensaladas es el empleo de almidones modificados que disponen de una gran cantidad de enlaces cruzados.

F.3.- Sales.

En el intervalo normal de pH de los alimentos, las moléculas de almidón no presentan grupos ionizables y por tanto son menos sensible a la sal que las moléculas de proteínas. En la mayoría de los casos, las concentraciones de sales en los alimentos son tan bajas que sus efectos en el almidón son mucho menos llamativos que los de otros ingredientes de los alimentos; conviene recordar que se han realizado bastantes estudios sobre los efectos de los iones en el almidón con resultados a menudo contradictorios. Estos aspectos han sido objeto de una excelente revisión realizada por Osman (1967).

F.4.- Grasas y agentes de superficie.

Conviene distinguir entre grasas que poseen agentes emulsionantes y las que carecen de los mismos, puesto que unas y otras tienen efectos opuestos. Las grasas compuestas fundamentalmente por triglicéridos de 16-18 átomos de carbono, carentes de emulsionantes, no ejercen efecto alguno en la viscosidad máxima alcanzada por el almidón, pero la temperatura a la que se alcanzó disminuía progresivamente a medida que se añadía más grasa, hasta llegar a un punto en el que no podía dispersarse más grasa en la mezcla.

Los monoglicéridos y compuestos similares con una cadena de gran número de átomos de carbono unidos a grupos hidrofílicos, influyen marcadamente en el comportamiento característico del almidón. Se desco-

noce el mecanismo por el cual estas sustancias ejercen tal acción.

A las personas interesadas en este problema les recomendamos la lectura de los trabajos de Osman y Dix (1960); Brockaw (1962) y Gray y Schoch (1962).

F.5.- Proteínas.

En el endospermo de cereales y leguminosas, el almidón y las proteínas están íntimamente asociados; indudablemente ni uno, ni otras, actúan independientemente durante el proceso de obtención de harina - (molturación). Sin embargo, todavía se desconocen estas interacciones y la metodología y sistemática más convenientes para su estudio (Bernardin y Kasarda, 1973).

F.6.- Leche.

El estudio del comportamiento de las mezclas de almidón y leche tiene un gran interés práctico y sin duda alguna, los principales componentes de las mismas son el almidón y las proteínas lácteas; no hay que olvidar sin embargo, que otros varios componentes lácteos influyen también, tanto por sus efectos directos en el almidón como indirectamente por sus efectos en las proteínas (Hwang, 1963). Se han hecho estudios amilográficos y se han analizado las influencias de las temperaturas y tiempos de pasteurización sobre la gelatinización del almidón - (Stalder, 1964; Osman, 1967).

IV.1.3.4. Métodos analíticos.

Como se ha dicho más atrás, el almidón se presenta en los vegetales en forma de pequeños gránulos cuyas características son típicas de su origen y procedencia. El aspecto visual y microscópico de estos -

granos puede, por lo tanto, servirnos para su identificación cualitativa, es decir, para señalar su presencia en aquellos productos que como la carne y derivados, en condiciones naturales carecan de este polisacárido.

Recordemos igualmente que cuando se calienta en condiciones de humedad el almidón absorbe agua, se hincha y pueden incluso romperse los gránulos teniendo lugar la extrusión de la fracción amilácea hidrosoluble. Por lo tanto, al analizar alimentos que hayan sido sometidos a un proceso de cocción deberá tenerse muy presente que, muchos, cuando no todos los gránulos de almidón, habrán sufrido este tipo de ruptura.

El calentamiento en seco determina la producción de dextrinas mediante una reacción que inicialmente implica cierto grado de despolimerización y oxidación de la molécula del carbohidrato. La persistencia o continuidad del calentamiento lleva a la degradación progresiva del almidón y a la formación de gomas con las profundas y consiguientes modificaciones estructurales de su molécula.

Asimismo, y como indicábamos en páginas anteriores, el almidón puede modificarse químicamente al introducir en su molécula diversos tipos de enlaces cruzados; estos almidones modificados tienen ciertas propiedades de gran interés en tecnología de los alimentos que han sido estudiadas, entre otros, por Howling (1974).

La mayoría de los procedimientos de análisis del almidón implican su previa hidrólisis y la estimación de los productos así obtenidos (corrientemente como glucosa). La estimación cuantitativa del almidón mediante su reacción con yodo, también constituye la base de algunos métodos. Asimismo, se han desarrollado ciertos métodos polarimétricos, para establecer el contenido en almidón de cereales y productos de

rivados fundamentalmente.

La hidrólisis con ácidos diluidos del almidón generalmente da unos resultados prácticamente coincidentes con su rendimiento teórico - en glucosa, por lo que constituye el fundamento de bastantes métodos - analíticos. La concentración del ácido utilizado para la hidrólisis varía bastante, pero normalmente se recomienda el empleo de ácido sulfúrico 0,4N para la hidrólisis en ebullición a reflujo, puesto que el empleo de ácido sulfúrico más fuerte no da en absoluto mejores resultados. Este procedimiento, cuando se utiliza con alimentos que contienen bastante proteína y grasa, da lugar a la formación de productos de condensación entre los aminoácidos y los carbohidratos resultantes de la hidrólisis, que limitan un tanto la utilidad del mismo.

Otra objeción que se puede hacer a la hidrólisis ácida directa del almidón es que, además de esta sustancia, se determinarán también todos los polisacáridos presentes que sean hidrolizables por el ácido. Cuando esto ocurra, debe recomendarse la llamada extracción selectiva o la hidrólisis selectiva.

A.- Extracción selectiva.

Los dos tipos principales de moléculas del almidón difieren notablemente en su solubilidad en solventes acuosos. Por ejemplo, la extracción en agua caliente de una muestra extraerá una cantidad considerable de amilosa y dextrinas, dejando en el residuo prácticamente toda la amilopectina.

La capacidad de disolución en agua de las dextrinas es de enorme importancia cuando se trata de analizar un producto amiláceo que ha sido sometido a temperaturas de ebullición, dado que en ciertos



Para la extracción acuosa se recomienda para la extracción de los azúcares antes de determinar el almidón. Las dextrinas son frecuentemente bastante solubles en soluciones hidroalcohólicas de aproximadamente el 20% (v/v), por lo que debemos ser cautos cuando se utilizan estos reactivos para la extracción de muestra.

Como agentes extractivos selectivos se han recomendado, el cloruro cálcico para el análisis del almidón de los cereales y derivados mediante polarimetría (Fraser y col., 1956); con alimentos de otra naturaleza sus resultados no son tan buenos.

El ácido perclórico se ha empleado como agente de extracción del almidón que se estima colorimétricamente, una vez tratado con el reactivo de antrona (Bolton, 1960) o precipitado en forma de un complejo de yodo (Pucher y col., 1948).

Otro agente selectivo utilizado ha sido el dimetil-sulfóxido, adicionado generalmente de ácido y seguido de una hidrólisis enzimática.

En resumen, son varios los procedimientos de extracción selectiva disponibles para la estimación del almidón de los alimentos; la elección del más conveniente dependerá de la naturaleza del alimento, de las disponibilidades del laboratorio y ¿porqué no? de la propia habilidad y preferencia del analista que deberá ser muy cauto cuando quiera aplicar alguno de estos métodos a un producto del que no se tenga experiencia previa.

B.- Hidrólisis selectiva.

Debe basarse exclusivamente en procedimientos enzimáticos dado que este tipo de hidrólisis es virtualmente imposible de realizar mediante procedimientos químicos, debido a que algunos de los polisacá-

ridos existentes en los alimentos son, como se ha dicho, mucho menos resistentes a la hidrólisis ácida que las moléculas del almidón.

Conviene sin embargo recordar que una preparación enzimática particular lo que hace es definir o incluir bajo el encabezamiento del almidón a todas aquellas sustancias que son hidrolizables por el enzima en cuestión.

El primer producto utilizado para el análisis enzimático del almidón era una mezcla de enzimas amilolíticos de procedencia fúngica. La más popular e importante de estas mezclas fué la "Takadiastasa", una mezcla de α y β amilasas. El producto obtenido al tratar el almidón con este "enzima" era una mezcla de maltosa y glucosa. No obstante, estas preparaciones fúngicas no pueden considerarse como verdaderamente específicas. Por ejemplo, se ha visto que las preparaciones de "Takadiastasa" tienen cierta actividad proteolítica e incluso celulolítica, aunque bajo las condiciones analíticas en las que corrientemente se utilizaban, las interferencias por la hidrólisis de otros polisacáridos eran mínimas e incluso la ligera actividad proteolítica observada podría considerarse como ventajosa (Southgate, 1976).

En la actualidad se dispone de amiloglucosidasas mucho más específicas; la mayoría de estos preparados comerciales siguen siendo de origen fúngico, pero al haber mejorado los procedimientos de purificación enzimática se han logrado preparaciones muy activas y específicas. Southgate (loc. cit.) hace un estudio detallado del empleo de estos preparados. Recordemos no obstante que en su utilización constituyen fases importantes la preparación de la muestra, las condiciones hidrolíticas y la eliminación de los polisacáridos que pueden interferir.

IV.1.4. Nitritos.

IV.1.4.1. Antecedentes.

La conservación de la carne y del pescado mediante la salazón, se ha venido practicando desde la más remota antigüedad, posiblemente - desde que uno de nuestros antepasados prehistóricos observó repetidamente que al desecarse algunas salinas los peces allí existentes permanecían mucho tiempo sin alterarse (Kaloyereas, 1950).

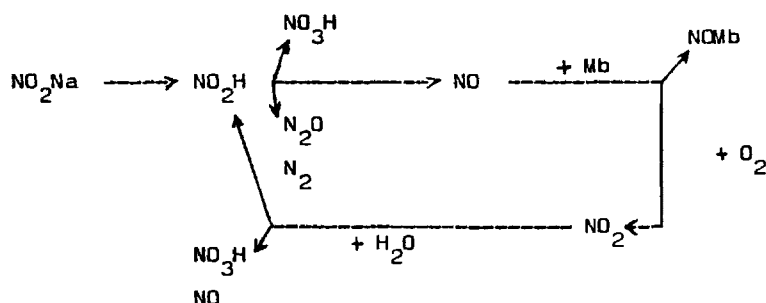
Aunque se desconocía la razón por la que la sal lleva a cabo su acción conservadora, se había observado que la que contenía pequeñas cantidades de salitre daba a la carne un color rojo mucho más agradable que la curada con sal libre de nitrato. Años después (Polenski, 1891) - se comprobaría que el agente responsable de la formación del color, que se denominó "color de carne curada", era el nitrito, originado por reducción microbiana del nitrato y Haldane en 1901, en su ya clásica publicación, explicó en términos químicos el mecanismo de la formación de este pigmento. También son dignos de mención los trabajos de Lewis y Vose (1926) y los de Kerr y col. (1926) que, sin duda alguna, influenciaron la vigente normativa sobre carnes curadas del Departamento de Agricultura de los E.E.U.U.

IV.1.4.2. Química del curado.

El interés del curado como sistema de conservación de la carne ha disminuido mucho al generalizarse la refrigeración y congelación, pero lo que no ha perdido actualidad es la consecución del color, aroma y sabor característico de las carnes curadas. Simplificando al máximo la química del curado puede decirse que obedece a la siguiente reacción:

Mioglobina + nitrito \longrightarrow Óxido nítrico-mioglobina.

Aún cuando Bard y Townsend (1971) señalen que la eficacia de la conversión del nitrito en óxido nítrico es mayor en la carne que en otros sistemas, puede afirmarse con Fujimaki y col. (1975) que falta todavía por resolver cuál es el destino del nitrato adicionado a la carne como agente del curado. Precisamente estos últimos investigadores han elaborado un esquema que intenta explicar el destino del nitrato adicionado a la carne, basándose en los resultados obtenidos con un sistema modelo compuesto de mioglobina, nitrito sódico, ácido ascórbico y un tampón de acetato ($\text{pH} = 5,5$):



Resumen sus resultados diciendo que en condiciones de acidez el nitrito adicionado pasa a ácido nitroso; éste, o bien se transforma en óxido nítrico y ácido nítrico o reacciona con el ácido ascórbico originando óxido nítrico y otros compuestos gaseosos (posiblemente óxido dinítrico y nitrógeno). Parte del óxido nítrico reacciona con la mioglobina dando nitrosomioglobina y parte lo hace con el oxígeno originando dióxido nítrico que reaccionando con el agua se transforma en ácido nítrico y ácido nitroso. El último, a su vez, da lugar a óxido nítrico.- Finalmente concluyen afirmando que todo el nitrito adicionado se transforma en nitrato, salvo el fijado a la nitrosomioglobina y el converti-

do en compuestos gaseosos estables tales como óxido dinítrico y nitrógeno gaseoso.

Cuando sólo se emplea el nitrato como agente del curado es difícil calcular la cantidad final de nitrito que se originará; si es excesiva surge la llamada "quemadura del nitrito" que consiste en la oxidación del pigmento de la carne curada que se presenta de color marrón. En los países en los que no se permite el empleo de nitritos como aditivo de los embutidos, la reducción de sus precursores, los nitratos, - se asegura con la utilización de "starters o fermentos" a base generalmente de Micrococcus (Niinivaara, 1955; Pohja, 1960; Valdecantos y García Matamoros, 1964; Sanz Pérez et al., 1966, 1975). Todavía quedan muchos aspectos del curado a los que sólo nos hemos referido superficialmente; a las personas interesadas en este problema les recomendamos las lecturas de las revisiones de Watts (1957), Hornsey (1959), Fox (1966), Bard y Townsend (1971), Möhler (1974), Krol (1976), Sanz Pérez (1977), etc.

IV.1.4.3. Efecto antimicrobiano.

Además de intervenir en la formación del color de la carne curada, el nitrito ejerce una acción protectora frente al Clostridium botulinum y otras bacterias causantes de intoxicaciones alimentarias, tales como Cl. welchii y estafilococos enterotoxigénicos.

El mecanismo íntimo de este efecto se desconoce todavía en muchos detalles, a pesar de la gran cantidad de trabajos publicados al respecto; Spencer (1969) e Ingram (1974) lo han revisado con suma atención.

Johnston y colaboradores (1969) atribuyeron al nitrito cuatro

posibles mecanismos mediante los cuales contribuiría a la conservación de las carnes curadas sometidas a tratamientos térmicos subletales.

- a) Aumentando la destrucción de las esporas por el calor.
- b) Acelerando su ritmo de germinación durante el tratamiento térmico, lo que iría seguido de la muerte de las germinadas.
- c) Previniendo la germinación de las esporas que sobrevivieron al tratamiento térmico y
- d) Produciendo una sustancia inhibidora al reaccionar el nitrito - con algún componente cárnico durante el procesado por el calor.

Asworth y Spencer (1972) estudiando los más importantes trabajos publicados sobre la acción antimicrobiana del nitrito, llegaron a afirmar que "cuando el nitrito sódico se calienta en determinados medios microbiológicos complejos se origina un potente inhibidor del crecimiento de diversas especies de clostridios. Inhibidor cuya naturaleza se desconoce y aunque se han aducido pruebas de que no tiene importancia en la estabilidad y conservación de las carnes tratadas por el calor, tales pruebas distan mucho de ser conclusivas". Sin embargo, estos mismos investigadores (loc. cit.) trabajando con carne de cerdo picada, inoculada con Cl. botulinum (tipos A, B y E) y con Cl. sporogenes (PA 3679) a la que se le adicionó nitrito sódico antes de someterla a un calentamiento subletal, pusieron de manifiesto un ligero efecto Perigo.

Según Ingram no puede sostenerse en la actualidad que el efecto del nitrito consista en aumentar la destrucción de las esporas por el calor; sería el contenido en cloruro sódico del medio en el que se pretende la germinación de aquéllas lo verdaderamente importante. Tampoco admite que el nitrito actúe acelerando el ritmo de germinación de las esporas durante el tratamiento térmico con la consiguiente destruc-

ción de las mismas. Lo que ocurre, según este investigador, es una inhibición de la germinación de aquellas esporas que sobrevivieron al tratamiento térmico. Tal inhibición se observa especialmente a pH ácido (Roberts e Ingram, 1966; Duncan y Foster, 1968).

Acaba afirmando que sometiendo al calor los medios de cultivo a los que se adicionó nitrito, se puede conseguir la inhibición microbiana completa si las concentraciones finales de nitrito oscilan entre 50 y 10 mg/Kg., algo que ocurre frecuentemente en la práctica.

Christiansen y colaboradores (1973) y Hustad et al. (1973) trabajando con jamón triturado y salchichas tipo "Frankfurt" respectivamente, comprobaron que la concentración de nitrito necesaria para la inhibición total de la toxigenesis dependía del nivel de contaminación esporular inicial; así con 90 esporas de C. botulinum por gramo de carne se originaba toxina en las muestras que incubadas a 27°C. contenían 150 p.p.m. de nitrito, pero no en las que poseían 200 p.p.m. Cuando la concentración esporular se elevó a 5.000 por gramo de carne, en las muestras que contenían 400 p.p.m. de nitrito se produjo toxina botulínica, pero no en las que poseían 500 p.p.m. Cuando se incubaron a 7°C. no hubo producción de toxinas. Los autores de ambas experiencias hacen hincapié en que es la concentración inicial de nitrito y no la residual la responsable del efecto inhibidor toxigenésico. Más recientemente Collins-Thompson y col. (1974) sostienen que cuanto mayor es la temperatura de almacenamiento y la concentración esporular del inóculo tanto mayor es la cantidad de toxina producida.

IV.1.4.4. Efectos sobre el sabor.

El nitrito ejerce una acción mejorante del sabor como señalaron Brooks y col. (1940), Barnett et al. (1965) y Cho y Bratzler (1970).

Wasserman y Talley (1972) señalan que en ausencia del nitrito sódico - una mezcla comercial de especias para "Frankfurts" fue incapaz de impartir al producto su aroma característico. Para estos investigadores el sabor típico de este alimento depende conjuntamente del ahumado y del nitrito. Hustad et al. (1973) opinan también que el aroma de las salchichas tipo "Frankfurt" elaboradas con carne de vacuno y de cerdo es muy superior en las que llevan nitrito que en las elaboradas sin este aditivo.

En el simposio de Zeist, Mottran y Rhodes (1974) presentaron los resultados de diversas investigaciones sobre el bacon que demostraron que a medida que en este producto aumentaba el nivel de nitrito de 0 a 1.000 p.p.m., el aroma lo hacía de una forma casi lineal, pero a partir de las 1.500 p.p.m. el aumento del aroma era mucho menor. Un experimento similar con embutido de maduración lenta, realizado por Skjelkvale, Tjaberg y Valland (1974), demostró que el nitrito mejora los atributos del aroma de la mayoría, e incluso quizás, de todos los productos cárnicos curados.

Se desconoce el mecanismo mediante el que el nitrito influencia favorablemente el aroma de los productos curados, aunque algunos (Bailey y Swain, 1973; Westerberg, 1973) opinan que es de tipo oxidante. Por ejemplo, Swain (1972) ha encontrado que el índice del ácido 2-tiobarbitúrico es mayor que en los jamones curados sin nitrito que en los que lo fueron con este aditivo.

IV.1.4.5. Toxicidad de los nitritos.

La primera vez que se demostró la peligrosidad de las nitrosaminas para el hombre fue en 1954 cuando Barnes y Magee observaron - las lesiones hepáticas producidas por la dimetilnitrosamina en dos ope

rarios de una fábrica en la que se empleaba esta sustancia como solvente. Dos años más tarde estos mismos investigadores comprobaron en las ratas el gran poder carcinogénico de la dimetilnitrosamina (Magee y Barnes, 1956).

Cuando Hansen (1964) y Koppang (1964) demostraron la aparición de lesiones hepáticas en visones y rumiantes que habían ingerido piensos a base de harina de pescado conservada con concentraciones de nitrato excesivamente altas, aumentando el interés general por las nitrosaminas, especialmente cuando de la harina de pescado responsable se aisló N-nitrosodimetilamina, algo que no ocurrió con la harina control. Se comprobó asimismo que diversas aminas presentes naturalmente en el pescado reaccionan con el nitrito dando nitrosaminas; resultado de una serie de investigaciones fue la demostración de la presencia de nitrosaminas en la harina de trigo, en la leche y en el queso (Hedler y Marquart, 1968), en las carnes curadas, en las setas (Ender y Ceh, 1968; Fazio *et al.*, 1971), en el pescado tratado con nitritos (Sen y col., 1970), en las especias (Sen y col., 1975), etc. Sin embargo también han sido varios los científicos que aseguran no haberlas encontrado en los alimentos humanos (Thewlis, 1968; Keybets y col., 1970; etc.). Hay que tener presente que, según Wolff y Wasserman (1972) muchos de los resultados de las primeras investigaciones deben admitirse con reparo ya que al mejorarse los métodos de análisis se ha comprobado la poca fiabilidad de bastante de los primeros.

Por otra parte se ha sugerido (Lijinsky y Epstein, 1970; Ender y Ceh, 1971) que ya antes de su ingestión, a temperatura ambiente y pH neutro, los nitritos y aminas secundarias de los alimentos podrían combinarse originando nitrosaminas. Se ha señalado asimismo que tal for

mación podría tener lugar muy rápidamente en el estómago una vez ingeridos con los alimentos los precursores de las nitrosaminas (Sander y Burkle, 1969; Sen y col., 1969).

También se ha comprobado que a pH neutro y en presencia de nitrato son varias las bacterias que en el intestino o en la vejiga urinaria (en casos de infecciones) originan nitrosaminas a partir de la difenilamina (Hawsworth y Hill, 1971; Ayanuba y Alexander, 1973; Thacker y Brooks, 1974; Harrison y Peat, 1975; etc.).

Tannenbaum (1972) comprobó que la saliva humana contiene cantidades significativas de nitrato y sulfocianuro, substancia que Boyland y col. (1971) demostraron que cataliza la reacción del nitrito con las aminas secundarias para dar nitrosaminas.

De los experimentos realizados se infiere que no hay duda alguna respecto de la toxicidad y carácter carcinogénico de las nitrosaminas para los animales, algo que se cree que acaece también en la especie humana, si bien no se ha demostrado concluyentemente; sin embargo, las muchas lagunas existentes, así como los bajos niveles de nitrosaminas hallados en los alimentos, dificultan mucho su evaluación toxicológica para el hombre.

En los productos cárnicos Mirvish y col. (1972) comprobaron que el ascorbato y el eritorbato bloqueaban la formación de nitrosaminas al reaccionar directamente con el nitrito; tal bloqueo es máximo a pH comprendido entre 3 y 4, y total cuando la relación molaridad ascorbato/molaridad nitrito es mayor o igual a 2.

La capacidad inhibidora de la reacción de nitrosación por parte de los ácidos ascórbico y eritórbito, que desde hace tiempo se vienen empleando en el curado como coadyuvantes del nitrito, se ha puesto

de manifiesto tanto en sistemas modelos, como en salchichas tipo "Frankfurt" y bacon (Herring, 1973).

Sen y col. (1976) han observado también que la adición al bacon (antes de su fritura) de 1.000 p.p.m. de propilgalato, piperacina, ascorbato sódico o ascorbil palmitato reducía drásticamente la formación de nitrosaminas durante dicho proceso culinario.

Podemos concluir este estudio diciendo que los nitritos de los alimentos y del agua de bebida, así como los originados a partir de los compuestos nitrogenados de fertilizantes, tabaco, ciertos contaminantes atmosféricos, etc., como posible fuente de nitrosaminas constituyen un grave problema cuya solución exige una dosis grande de dedicación e imaginación investigadora de cuantos se esfuerzan por mejorar la higiene, la nutrición, la medicina y, por supuesto, la ciencia y la tecnología de los alimentos.

A las personas interesadas en las nitrosaminas les recomendamos la lectura de las revisiones de Druckery y col. (1967), Magee y Barners (1967), Sander y Schweinsberg (1972), Wolff y Wasserman (1972), Sebranek y col. (1973), Scanlan (1975), Crosby y Sawyer (1976), Klein et al. (1976).

Otros inconvenientes que se han atribuido a los nitritos y a sus precursores los nitratos, además de los señalados, son la intoxicación crónica a consecuencia de su ingestión continuada, que origina hipertrofia tiroidea con alteraciones del metabolismo del yodo, la destrucción por oxidación de la vitamina A en el intestino y la alteración de las rutas de conversión del caroteno en vitamina A, todo lo cual puede dar lugar a serias deficiencias en esta vitamina (Stoewsand, 1972).

Los nitratos per se son tóxicos a concentraciones muy superiores a las que se encuentran en nuestros alimentos. De acuerdo con la F.A.O./O.M.S. una dosis única de 1 g. puede originar intoxicación en el hombre y si se eleva a 8 g. dar lugar a la muerte. La dosis letal de nitrito es mucho menor, oscilando entre 0,18 y 2,5 gramos. Los niveles de nitrato en los alimentos consumidos por el hombre no son suficientes para originar intoxicaciones, sin embargo, si las condiciones de almacenamiento lo permiten se transforman en nitritos y éstos sí son tóxicos a concentraciones bastante menores, según acabamos de ver. El efecto tóxico del nitrito se debe a la oxidación del ión ferroso de la hemoglobina sanguínea a ión férrico de metahemoglobina. Este cambio, que es irreversible, no se acompaña de alteración o destrucción globular alguna.- La metahemoglobina no actúa como transportador de oxígeno y los tejidos orgánicos presentan anoxemia debido no solo a esta incapacidad de transporte de oxígeno por la sangre, sino también a la dificultad de "soltar o desprender" el oxígeno disponible. En una mezcla de metahemoglobina y oxihemoglobina la curva de disociación de la oxihemoglobina:

$\text{HbO}_2 \rightleftharpoons \text{Hb} + \text{O}_2$, está desplazada a la izquierda con lo que el oxígeno disponible para los tejidos es cada vez menor (Phillips, 1968).

Cuando en la sangre hay más de un 5% de metahemoglobina se aprecia una ligera cianosis y cuando la concentración alcanza el 70% del total del pigmento sanguíneo se produce la muerte por asfixia (Knotes y Schmidt, 1964). En los niños menores de 3 meses y en individuos anémicos concentraciones menores del 70% son ya letales; en los primeros ello es consecuencia de la presencia en su aparato circulatorio de sangre fetal cuya hemoglobina es más fácilmente oxidada. De aquí que el Comité Conjunto de la F.A.O./O.M.S. recomiende que bajo ningún concep

to se adicionen nitratos a los alimentos para bebés y prohíba el empleo de aguas ricas en estas sales para la preparación de alimentos infantiles.

La abundancia de nitratos en determinadas cosechas de hortalizas, como consecuencia de las modernas técnicas de explotación agraria, su acumulación en determinadas partes de los vegetales comestibles, la posible nitrificación exógena durante el almacenamiento de las hortalizas, el aumento general del contenido en nitratos de las aguas e incluso la nitrificación endógena intestinal como consecuencia de ciertas disbiosis bacterianas intestinales, etc., etc., han hecho que se preste una gran atención por parte de los organismos internacionales a la alimentación infantil y sobre todo a la tecnología de la preparación de determinados productos precocinados para la alimentación de bebés. El tema es muy polémico y estamos aún lejos de su completa solución; a las personas interesadas les recomendamos la lectura de los trabajos de Bodansky (1951), Phillips (1968, 1971), Vu y Bourrinet (1976), etc.

IV.1.4.6. Métodos analíticos.

La mayoría de las "sales del curado" suelen llevar un 10% de su peso de nitrato -cantidad máxima autorizada- y una proporción de nitrito sódico que no supere el 0,6%.

La legislación española es muy oscura en lo referente a cantidades de nitratos y nitritos permitidas en los productos cárnicos y, por ejemplo, en lo referente a chorizo, salchichón y lomo embuchado la Orden de la Presidencia del Gobierno del 21 de junio de 1977 (Boletín Oficial del Estado del 12 de julio de 1977) se limita a señalar que las cantidades a utilizar serán "las dosis permitidas por la Dirección Gene

ral de Sanidad". Hasta la fecha esta Dirección no ha indicado cuales - son tales dosis.

Por otra parte las normas de calidad para jamón cocido, paleta cocida, fiambre de paleta y pastel de carne de cerdo, destinados al comercio español permiten 200 mg. de nitrito/Kg. neto de producto acabado y 500 mg. de nitrato/Kg. neto del mismo producto (Orden de la Presidencia del Gobierno del 17 de septiembre de 1975, publicada en el Boletín Oficial del Estado del 27 de septiembre de 1975).

Estas cantidades, al parecer, superan bastante a las mínimas necesarias para alcanzar el efecto beneficioso del nitrito, al que nos hemos referido más atrás, por lo que en la mayoría de los países están sometidas a revisión para evitar que las cantidades totales ingeridas no sólo con los productos cárnicos, sino también con hortalizas, quesos e incluso agua de bebida, etc., se mantengan por debajo de las consideraciones tóxicas (Faccini y col., 1969).

Corrientemente el problema con que se enfrenta el analista - cuando pretende establecer el contenido en nitratos y nitritos de un embutido madurado es el señalar cual era la cantidad inicialmente adicionada a la pasta, algo imposible de realizar en el estado actual de nuestro conocimiento debido a que dependiendo del tiempo madurando, del tipo de flora microbiana existente en el embutido, de la técnica analítica utilizada, etc., etc., los resultados varían mucho. Las interacciones a que se ven sometidas estas sales en un substrato tan complejo como la pasta de un embutido en maduración, tampoco son ajenas a este problema, cuya solución interesa cada día más desde que se ha descubierto su papel como precursores de las nitrosaminas (Usher y Telling, 1975).

Aunque la estimación de nitratos en los embutidos tiene esca-

so interés, conviene recordar que se lleva a cabo por espectrofotometría y que atendiendo al principio implicado puede clasificarse en tres grupos: a) Nitración de una sustancia de naturaleza fenólica; b) Oxidación por el nitrato de un compuesto orgánico y c) Reducción del nitrato a nitrito o amoniaco. De acuerdo con Hatcher y Schall (1965) los análisis de aquellos productos que contienen materias orgánicas hidrosolubles y niveles muy bajos de nitratos, dan resultados poco o nada reproducibles cuando se sigue algún procedimiento basado en los principios anteriores.

La mayoría de los métodos, comúnmente usados para la determinación del nitrito en solución acuosa, están basados en la reacción del nitrito con una amina primaria en solución ácida para formar una sal de diazonio. Esta sal se trata después con un compuesto aromático, que generalmente lleva grupos amina u oxhidrilo para formar un color azo que se mide espectrofotométricamente.

Aunque hay una amplia gama de aminas que sirven tanto de reaccionantes del nitrito como agentes de copulación, en las técnicas más corrientes sólo se utilizan unas pocas, como lo muestra la tabla V.

En el método oficial de estimación de nitrito en los productos cárnicos recomendado por la A.O.A.C. (1975), se emplea la 1-naftilamina. No obstante, se ha comprobado que la 1-naftilamina y sus productos de oxidación son carcinógenos, por lo tanto deberán ser manejados con cuidado (Radomski y col., 1971; U.S. Department of Health Education and Welfare, 1971; Teichmann y Schramm, 1973; American Public Health Association, 1975; Usher y Telling, 1975). En consecuencia en el Reino Unido ha sido prohibido su uso, sustituyéndola por el ácido 1-naftel-sulfónico o por el diclorohidrato de la 1-N-naftil-etilendiamina. La

rapidez con que se desarrolla el color en una gran variedad de concentraciones de nitrito, cuando se emplea el reactivo ultimamente citado, lo ha convertido en el más frecuentemente empleado en muchos y distantes laboratorios (Usher y Telling, loc. cit.).

A pesar de las excelentes revisiones publicadas sobre análisis de nitratos y nitritos en la carne y productos cárnicos (Taras, - 1958; Schuller y Veen, 1967; Boltz, 1973; Usher y Telling, 1975; etc.) todavía no existen normas universalmente aceptadas y hay bastante controversia al respecto, como se deduce del estudio de la bibliografía publicada. En España los datos son muy escasos, por lo que hemos considerado oportuno estudiar este aspecto.

TABLA V.

Sistemas corrientes de acoplamiento usados para la determinación colorimétrica del nitrito.

Autor	Amina aromática.	Reactivo copulante.	Tiempo para el desarrollo del color. (min.)
Griess-Ilosvay (1879)-(1889)	Ac. sulfanílico	1-naftilamina.	25-60
Adriaanse y Robbers. (1969)	Ac. sulfanílico.	Ac. 1-naftol-7-sulfónica.	25
Follet y Ratcliff. (1963)	Ac. sulfanílico.	1-naftol.	34
Bratton y Marshall. (1939)	Ac. sulfanílico.	1-N-naftil-etilendiamina.	10
Shinn (1941).	Sulfanilamida.	1-N-naftil-etilendiamina.	10
Kamm y col.(1965)	1-naftilamina.	1-naftilamina.	120

IV.2. MATERIAL Y METODOS.

IV.2.1. Determinación de la glucono- δ -lactona.

La determinación de la G δ L se llevó a cabo en diversas muestras obtenidas a partir de chorizo, salchichón y salami de varias firmas comerciales.

La estimación de la G δ L se realizó siguiendo el método cromatográfico descrito por Braun y Hieke (1966).

IV.2.1.1. Extracción.

Se pesó una cantidad de muestra (alrededor de 20 gramos) y se homogeneizó en un aparato M.S.E. con 5 volúmenes de agua destilada durante dos minutos; la suspensión así formada se sometió a ebullición durante 10 minutos y posteriormente se introdujo en un frigorífico a 4°C. donde se mantuvo el tiempo suficiente (aproximadamente 3 horas) para que solidificara la materia grasa. Transcurrido este tiempo se eliminó la capa lipídica y el resto se filtró a través de papel Whatman N° 1.

Una alícuota del filtrado se mezcló a partes iguales con NaOH 0,1N. Dicha mezcla se calentó a 70°C. durante 10 minutos en baño maría. El exceso de NaOH se tituló con ClH 0,1N utilizando como indicador solución alcohólica de fenolftaleína al 1%. Otra alícuota del filtrado exactamente igual, se neutralizó con un volumen exacto de NaOH 0,1N, calculada a partir de la titulación anterior. De esta solución se tomaron las muestras empleadas posteriormente para la cromatografía.

IV.2.1.2. Cromatografía en capa fina.

La cromatografía se realizó en capas de sílica gel G-60, preparadas según II.2.2. y activadas mediante calentamiento a 110°C. duran

te 30 minutos.

Las cromatografías se desarrollaron en cámaras sin saturar, utilizando como fase móvil una mezcla de n-propanol/n-butanol/agua (1/1/1) (v/v/v). El revelado se realizó, previo secado de las placas en estufa de aire forzado a 60°C., con una solución oxidante constituida por metaperyodato sódico al 0,1%. La zona de migración del ácido glucónico, - del ascórbico y de diversos azúcares aparece como manchas blancas. Posteriormente se hizo un segundo revelado pulverizando con el reactivo de bencidina (solución en etanol de 96% de bencidina al 3,5% ClH, 1N/acetona/agua) (80/1,5/30/70) (v/v/v/v). La zona ocupada por la G.L. toma un color amarillo, mientras que el resto de las sustancias permanecen con el color blanco que adquirieron al pulverizar las placas con peryodato.

IV.2.2. Determinación de las proteínas de soja.

La determinación de las proteínas de soja se llevó a cabo en diversas muestras obtenidas a partir de salchichas tipo "Frankfurt" y mortadelas de varias firmas comerciales.

Para la determinación de las proteínas de soja se siguió, en esencia, el método descrito por Homayounfar (1975).

IV.2.2.1. Preparación de la muestra.

Se pesó una cantidad de muestra picada (alrededor de 1 gramo), previamente esterilizada (en caso de productos frescos o pasteurizados), y se homogeneizó cuidadosamente en un aparato M.S.E. con 10 volúmenes - de ácido tricloroacético al 10%. La mezcla se agitó durante 20 minutos y después se centrifugó a 4.000 r.p.m. durante otros 20 minutos. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y al sedimento se le añadieron

10 volúmenes de ácido tricloroacético al 5%; se agitó bien y se centrifugó durante 40 minutos. Finalmente se lavó el sedimento por centrifugación con agua destilada.

Todas estas operaciones se realizaron en cámara fría (0-1°C).

A) Extracción de los lípidos.

Al sedimento obtenido en las operaciones que se describen en el apartado anterior se le añadieron 10 ml. de metanol; se agitó durante 10 minutos y se centrifugó. Se eliminó el sobrenadante y se añadió otro volumen igual de una mezcla de cloroformo/metanol (1/1) (v/v), se agitó durante dos horas y se centrifugó. A continuación se le añadieron al sedimento 12 volúmenes de una mezcla de cloroformo/metanol (3/1) (v/v), se agitó durante 3 horas y se centrifugó. Se recogió el sedimento y las últimas trazas de disolvente se eliminaron hasta sequedad haciendo pasar a su través una corriente de nitrógeno. Todas las operaciones se llevaron a cabo a 1°C.

B) Extracción proteica.

El extracto obtenido se trituró en un mortero y se le añadieron 8 ml. de una solución compuesta por fenol/ácido acético/agua (2/1/1) (v/v/v) (Work, 1964; Takayama y col., 1966) y se dejó durante una hora a temperatura ambiente. A esta solución se le añadió urea hasta alcanzar una concentración 5M. Si la solubilización no era perfecta - se añadía urea hasta concentración 8M.

El extracto final se conservó bajo congelación a -20°C. hasta el momento de su empleo.

IV.2.2.2. Electroforesis.A) Preparación del gel de acrilamida 7,5%.

Para la preparación de este gel se emplearon las disoluciones siguientes (Takayama y col., 1966):

Solución A

Acrilamida 10 g.
 NN'metilen bisacrilamida 0,28 g.
 Urea 20 g (5M) ó 24 g (8M).
 Acido acético 46,9 ml.
 H₂O csp. 100 ml.

Solución B

Persulfato amónico 1,5%.

Estas disoluciones se conservaron en nevera durante 3 ó 4 semanas.

De acuerdo con los autores citados se pueden variar las concentraciones de acrilamida (con una concentración más fuerte la electroforesis es más lenta y las bandas son menos difusas) y de urea (una concentración más fuerte puede mejorar la nitidez de las bandas). Sin embargo, en las condiciones que se describen en este trabajo sólo se consiguió una mejor resolución aumentando la concentración de urea a 8M, tanto en la muestra como en el gel.

A partir de las soluciones A y B se hizo la mezcla siguiente, con la cual se pueden preparar hasta 12 tubos:

Solución A 12 ml.
 Solución B 4 ml.

NNN'N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) ... 0,08 ml.

Urea 2,4 g (5M) ó 2,88 g (8M).

La mezcla se preparó, inmediatamente antes de su uso, agitando con cuidado para evitar la formación de burbujas de aire.

Los tubos de electrofresis (75 mm. x 5 mm.) se llenaron con esta mezcla hasta unos 5 mm. de su extremo superior, depositándola cuidadosamente en las paredes y dejándola deslizar por las mismas, con el fin de que no aparecieran burbujas de aire en el interior. Inmediatamente después se adicionaron dos gotas de agua destilada, para evitar la formación de un menisco cóncavo.

A continuación se dejaron polimerizar a la temperatura ambiente durante dos horas o a 30°C. durante una hora. Una vez polimerizados, se eliminó totalmente el agua añadida invirtiendo los tubos y secando con ayuda de una tira de papel de filtro.

La muestra (10-50 μ l.) se colocó cuidadosamente en la superficie superior del gel con una micropipeta graduada y se rellenó el resto vacío del tubo con ácido acético al 75%.

8) Desarrollo electroforético.

Los tubos se colocaron en la cubeta superior del aparato y a los recipientes superior e inferior se les añadió una cantidad suficiente de ácido acético al 10%.

La electroforesis se desarrolló aplicando primero una corriente de 1 mA/tubo a 180 V. durante 8 minutos (tiempo de premigración) e inmediatamente después una corriente de 5 mA/tubo a 180 V. durante 80 a 90 minutos (tiempo de migración propiamente dicha).

Siendo el pH de la solución de ácido acético inferior al pun-

to isoeléctrico de las proteínas, éstas emigran en dicho medio como los cationes, del ánodo al cátodo. Por lo tanto, se cambió la posición "normal" de los electrodos del aparato de electroforesis Canalco 1200 a la posición "reverse".

Finalizado el desarrollo electroforético se retiraron los geles de los tubos inyectando agua destilada entre el gel y la pared del tubo.

C) Tinción y fijación de las bandas.

Una vez extraídos los geles de los tubos de electroforesis, - se traspasaron a tubos de ensayo a los que se les adicionó el colorante (solución de azul-negro de anilina al 0,25% en ácido acético al 3,5%) en cantidad suficiente para cubrirlos totalmente donde se mantuvieron durante dos horas.

Una vez teñidas las bandas se procedió a la eliminación del colorante, para lo cual los geles ya teñidos se colocaron en tubos especiales sin fondo cerrados con un poco de gel separador polimerizado. En estas condiciones se llevaron al aparato de electroforesis; los recipientes superior e inferior se rellenaron con solución decolorante - de ácido acético al 7% y se les aplicó una corriente de 8 mA por tubo, hasta lograr un gel transparente en el que sólo se apreciaban teñidas las bandas de proteínas.

Para la conservación posterior de los geles decolorados se transfirieron a tubos de ensayo donde se mantuvieron sumergidos en una solución de ácido acético al 7%.

Como los métodos de precipitación proteica y de extracción - de lípidos recomendados por la técnica de Homayounfar eran muy comple-

jos y requerían mucho tiempo, tuvimos que modificarlos de la siguiente manera:

Una cantidad de muestra, previamente esterilizada (en caso de productos frescos o pasteurizados) se trituró con 10 volúmenes de agua durante 10 minutos. Posteriormente se le añadieron 15 volúmenes de ácido tricloroacético al 20% y la mezcla se agitó enérgicamente durante 20 minutos. Finalmente se centrifugó durante 20 minutos a 4.000 r.p.m.

Para la extracción de los lípidos al sedimento obtenido se le añadieron 25 volúmenes de una mezcla de cloroformo/metanol (1/1) (v/v); se agitó durante una hora y se centrifugó. Dicha extracción se repitió y del sedimento obtenido se eliminaron las últimas trazas de disolvente mediante una corriente de nitrógeno. Todas estas operaciones se llevaron a cabo a 1°C.

La extracción proteica y la electroforesis se realizaron de acuerdo a la técnica descrita (véase apartados IV.2.2.1.B. y IV.2.2.2).

Los resultados obtenidos con ambos métodos eran idénticos, si bien con las modificaciones introducidas el tiempo requerido para los análisis se redujo de 12 horas en el método original a solo 7 que se necesitan con nuestra modificación.

IV.2.3. Determinación del almidón.

La determinación del almidón se llevó a cabo en muestras obtenidas a partir de salchichas tipo "Frankfurt" y mortadelas de varias firmas comerciales existentes en el mercado español. Todos estos productos fueron fabricados en España, excepto tres muestras de salchichas que procedían de Alemania Federal.

Para la determinación del almidón se siguieron dos métodos, uno cualitativo y otro cuantitativo.

IV.2.3.1. Método cualitativo.

Este método está destinado a detectar de una forma rápida la presencia de almidón en las muestras.

Se siguió el descrito por Casares (1954), basado en que el almidón toma una coloración azul-negra intensa en presencia de yodo.

Para ello se tomó una cantidad de muestra picada (alrededor de 10 gramos) y se le añadieron 5 volúmenes (p/v) de agua destilada y se sometió a ebullición en baño maría durante 10 a 15 minutos. Posteriormente se tomaron unos 10 ml. del fondo del matraz y se llevaron a un tubo de ensayo. Se enfrió el tubo al chorro de agua fría y se le añadieron unas gotas de Lugol: {yodo / yoduro potásico / agua destilada - (1/2/200) (p/p/v).}.

IV.2.3.2. Método cuantitativo.

La determinación cuantitativa del almidón se efectuó de acuerdo con el método descrito por Glover y col. (1966) que se basa en la separación de los azúcares y la grasa de la muestra, permaneciendo solo en ella el polisacárido que posteriormente se hidroliza con un ácido débil, determinándose la glucosa del extracto final con reactivo de antrona.

A) Extracción de azúcar y de grasa.

Se pesó una cantidad de muestra picada (en torno a 2 gramos) que se agitó enérgicamente con 25 ml. de una mezcla de etanol/éter de petróleo (1/3) (v/v) y se centrifugó a 2.500 r.p.m. durante 5 minutos. Se eliminó la porción alcohólica-etérea y al sedimento se le añadieron 10 ml. de etanol caliente (80°C.) al 80%, agitándose a continuación y

sometiéndolo a centrifugación durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se repitió la extracción alcohólica del sedimento en las mismas condiciones.

B) Extracción del almidón.

Al sedimento obtenido, como se indica en el apartado anterior, se le añadieron 5 ml. de agua destilada y 6,5 ml. de ácido perclórico - al 52%, se agitó durante 5 minutos y se mantuvo en reposo durante 15 minutos. Posteriormente se le añadieron 20 ml. de agua destilada y se centrifugó durante 5 minutos. El sobrenadante se recogió en un matraz aforado de 100 ml. y al sedimento se le añadieron 5 ml. de agua destilada y 6,5 ml. de ácido perclórico al 52%. Se agitó y se dejó en reposo durante 30 minutos. Finalmente se recogió el contenido entero del tubo en el matraz que contenía el primer extracto, se enrasó con agua destilada y se filtró a través de papel Whatman Nº 12.

C) Determinación de glucosa.

C.1. Método de Glover y col. (1966).

En un matraz aforado se diluyeron 5 ml. del filtrado obtenido en el apartado B en 200 ml. de agua destilada. Un volumen de esta disolución se mezcló con dos volúmenes de reactivo de antrona (solución de antrona al 0,2% en ácido sulfúrico al 95,5%) en un tubo de ensayo que se mantuvo sumergido en un baño de agua fría durante unos minutos. La mezcla se agitó bien y se calentó en un baño de glicerina a 100% durante 7,5 minutos. Inmediatamente después se enfrió rápidamente en un baño maría a 25°C. y se determinó la absorbancia a 630 nm. El color permanecía fijo durante 30 minutos, pasado este tiempo la absorbancia

comenzaba a disminuir.

Las lecturas se refirieron a una gráfica patrón preparada con glucosa (figura 15) tratada de la misma forma.

El reactivo de antrona, conservado a 0°C. aproximadamente, se mantiene sin alterar durante 3-4 días.

C.1.1. Determinación del almidón.

Se hizo de acuerdo con la fórmula propuesta por Glover y col. (1966):

$$\% \text{ Almidón} = \% \text{ Glucosa} \times 1,06.$$

C.2. Método de Dubois y col. (1956).

Debido a las precauciones que se han de tomar con el reactivo de antrona para leer la densidad óptica y a la inestabilidad del mismo, el contenido en glucosa se determinó también mediante el método propuesto por Dubois y col. (1956), que es más fácil de aplicar y además tiene la ventaja de que la coloración formada es estable durante mucho más tiempo.

A 2 ml. de la disolución acuosa del hidrato de carbono, obtenida según se describe en el apartado C.1., se le adicionó 1 ml. de fenol al 5%; luego se le añadieron rápidamente 5 ml. de ácido sulfúrico concentrado de densidad 1,84. La mezcla se dejó estar a la temperatura ambiente 10 minutos y posteriormente se sometió durante 20 minutos al baño maría (25-30°C.).

Se leyó la extinción a 490 nm. y las lecturas se refirieron a una curva patrón construida con glucosa (figura 16).

El cálculo del contenido en almidón se realizó según se describe en C.1.1.

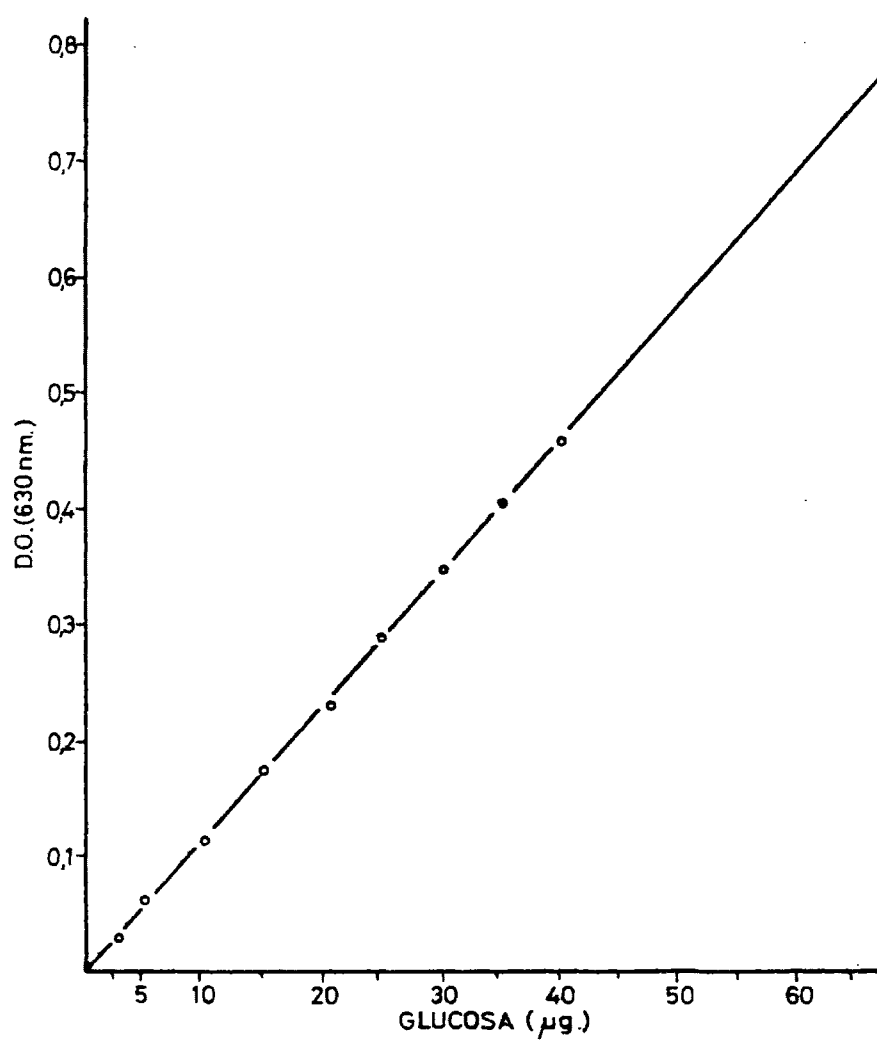


FIGURA 15: GRAFICA PATRON PARA LAS DETERMINACIONES DE GLUCOSA POR EL METODO DE GLOVER Y COL.(1966).

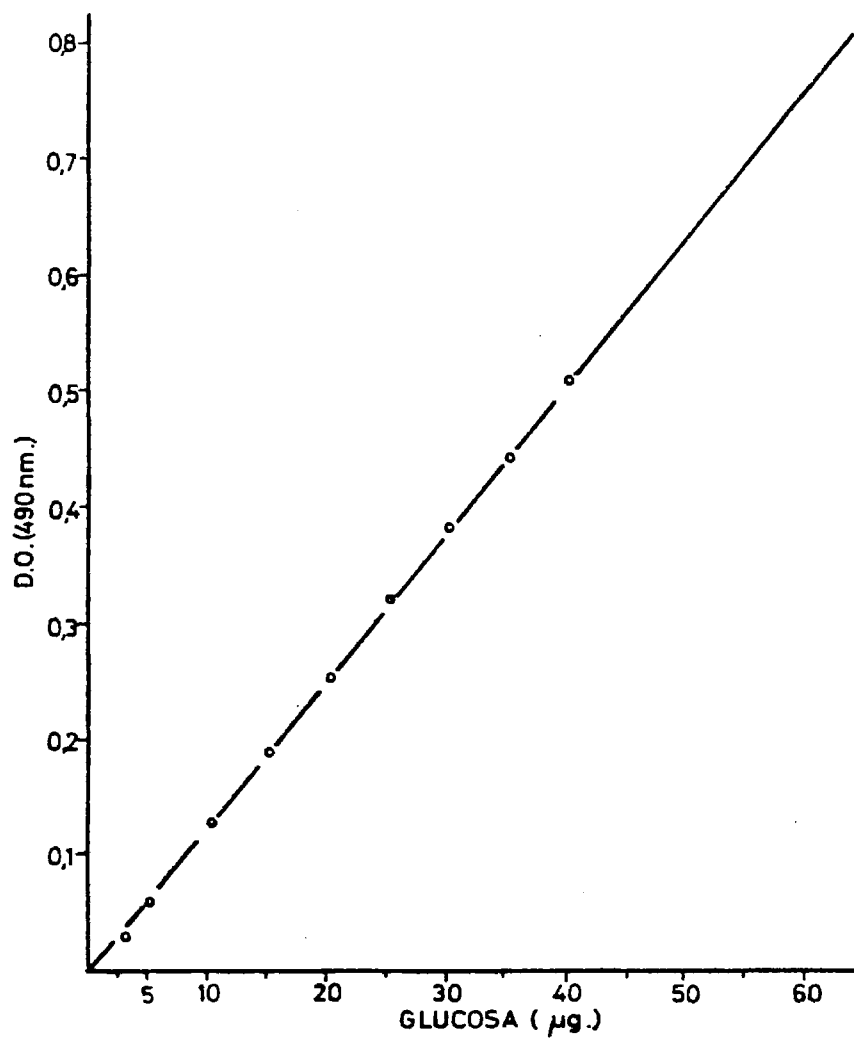


FIGURA 16: GRAFICA PATRON PARA LAS DETERMINACIONES DE GLUCOSA POR EL METODO DE DUBOIS Y COL.(1956).

IV.2.4. Determinación de nitritos.

La determinación de nitritos se llevó a cabo en muestras obtenidas a partir de salchichas tipo "Frankfurt", mortadelas, jamones tipo "York" y chorizos de varias firmas comerciales.

La determinación de nitritos se realizó de acuerdo con la Norma Internacional ISO/DIS 2918.

IV.2.4.1. Reactivos.

A) Soluciones utilizadas para la precipitación de proteínas.

A.1. Reactivo I: Disolución acuosa de ferrocianuro potásico ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) al 10,6%.

A.2. Reactivo II: Se preparó disolviendo 22 gramos de acetato de zinc dihidratado ($(CH_3COO)_2Zn \cdot 2H_2O$) y 3 ml. de ácido acético glacial en agua destilada hasta un volumen de 100 ml.

A.3. Solución saturada de borax: Solución acuosa de tetraborato disódico decahidratado ($B_4O_7Na_2 \cdot 10H_2O$) al 5%.

B) Reactivo colorimétrico.

B.1. Solución I.

Disolución de ácido sulfanílico al 0,6% y ClNa al 2% en ácido acético glacial del 20%. Para lograr la total solución de los productos químicos es necesario calentar al baño maría.

B.2. Solución II.

Mezcla al 1:2 (v/v) de una solución acuosa de α naftilamina al 0,3% y ácido acético glacial. Este reactivo se filtró posteriormente y se enrasó a 1.000 ml. con agua destilada. Para disolver la α naftilamina es necesario calentar al baño maría.

Por su carácter cancerígeno, es necesario manipular esta solu
ción con precaución.

Ambas soluciones se conservaron en frascos topacio, bien ce-
rrados. El reactivo colorimétrico se preparó mezclando volúmenes igua-
les de las dos soluciones; se puede conservar bajo refrigeración una se
mana como máximo.

IV.2.4.2. Precipitación de las proteínas.

Se pesó una cantidad conocida de muestra picada (alrededor de
10 gramos) en un erlenmeyer y se le añadieron sucesivamente 5 ml. de la
solución saturada de borax (A.3) y 100 ml. de agua destilada a una tem-
peratura de 70°C. como mínimo. Dicha mezcla se calentó hasta ebulli-
ción introduciendo el matraz en un baño maría, agitándolo ocasionalmen-
te. Se dejó enfriar a la temperatura ambiente y se mezcló cuidadosamen-
te con 2 ml. del reactivo I (A.1) primero y después con 2 ml. del reac-
tivo II (A.2).

La mezcla se trasvasó a un matraz aforado de 200 ml., y se
ajustó el volumen con agua destilada, se dejó reposar durante 30 minu-
tos a la temperatura ambiente. Finalmente se mezcló cuidadosamente y
se filtró a través de papel de filtro de pliegues, exento de nitritos.

IV.2.4.3. Determinación colorimétrica.

Se tomó una alícuota de 10 ml. del filtrado anterior y se mez
cló con un volumen igual del reactivo colorimétrico (B). Si la alícuota
del filtrado era menor de 10 ml. se completaba hasta 10 ml. con agua -
destilada.

Se agitó y se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura
ambiente, al abrigo de la luz solar directa.

Pasados 20 minutos y antes de transcurrir 4 horas, se midió la densidad óptica de la solución a 520 nm. Cuando el color de la solución problema fue muy intenso se diluyó de forma apropiada.

Las lecturas se refirieron a una gráfica patrón confeccionada a partir de una solución de nitrito sódico (figura 17), tratada de la misma forma.

IV.2.4.4. Cálculo.

Se calculó el contenido en nitrito de la muestra en miligramo de nitrito sódico por Kilogramo con ayuda de la fórmula siguiente:

$$\text{NO}_2\text{Na (mg./Kg.)} = c \times \frac{2000}{m.v}$$

donde:

m = peso de la muestra en gramos.

v = volumen, en ml., de la alícuota del filtrado tomada para la determinación colorimétrica.

c = concentración en nitrito sódico, expresada en $\mu\text{g./ml.}$, determinada en la curva patrón a partir de la densidad óptica de la solución preparada a partir de la muestra.

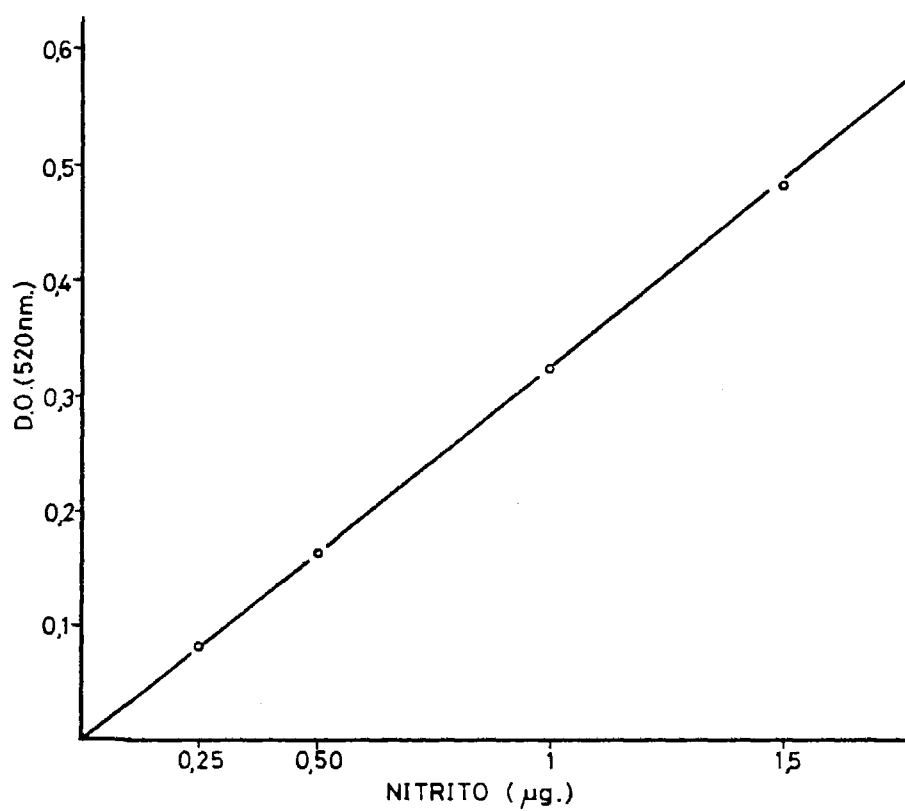


FIGURA 17: GRAFICA PATRON PARA LAS DETERMINACIONES DE NITRITO.

IV.3. RESULTADOS Y DISCUSION.

IV.3.1. Glucono- δ -lactona.

Los estudios que se recogen en este apartado están encaminados a demostrar el grado de incidencia de la G δ L en algunos productos cárnicos existentes en el mercado español y a analizar los efectos que la G δ L tiene sobre las características organolépticas de los chorizos.

IV.3.1.1. Determinación de glucono- δ -lactona.

La determinación de G δ L se llevó a cabo en una serie de embutidos ("salamis", chorizos y salchichones), cuyas fases de elaboración desconocíamos, así como en chorizo elaborado bajo nuestra dirección en una fábrica española siguiendo el procedimiento industrial normal de la misma. Este chorizo solo se diferenciaba del "comercial" en que se le había adicionado a la mezcla para embutir un 3% de G δ L.

Salvo estos chorizos, los demás permanecían a firmas comerciales distintas y se adquirieron en supermercados madrileños. En total se analizaron 160 muestras que pertenecían a 4 marcas comerciales diferentes en el caso del salami y a 18 fabricantes distintos en el caso del chorizo y del salchichón. La detección de dicho aditivo se realizó siguiendo el método de Braun y Hieke (1966), según se describe en IV.2.1.

Alicuotas de los extractos obtenidos de las muestras, así como una solución patrón al 1% de G δ L, se cromatografiaron en capa fina de sílica gel G-60 y se desarrollaron con n-propanol/n-butanol/agua - (30/30/30) (v/v/v). Cada placa se reveló primero con una solución de metaperyodato sódico al 0,1% y después con el reactivo de bencidina. Se incluyeron además patrones de ácido ascórbico y diversos monosacáridos y disacáridos con el fin de observar su comportamiento frente al reac-

tivo de bencidina y comprobar si se podía confundir el ácido glucónico con alguno de los azúcares existentes en los embutidos.

Mientras que el ácido ascórbico, la glucosa, la sacarosa y la lactosa aparecían como manchas blancas que presentaron Rfs. de 0,39; - 0,50; 0,43 y 0,33 respectivamente, la zona ocupada por la GδL, tomó un color amarillo al tratarla con el reactivo de bencidina; su Rf fué de 0,27. El metaperyodato en aquellas zonas donde no había ninguna sustancia reaccionó con la bencidina dando un color azul.

El color amarillo de la mancha correspondiente a la GδL se debe a que este producto, como se indica más atrás, se transforma en ácido glucónico que al ser oxidado por el metaperyodato sódico, da aldehído fórmico, que con la bencidina determina la aparición de la coloración amarilla típica (Covedor et al., 1970).

La figura 18, muestra un mapa cromatográfico típico de un extracto de salami; como puede apreciarse su cromatografía se realizó conjuntamente con la de un patrón de GδL recientemente preparado, hecho que también se llevó a cabo en los cromatogramas de chorizos y salchichones. Las figuras 19 y 20 corresponden a dos cromatogramas de extractos de chorizo y las 21 y 22 a los extractos de salchichón.

Como puede apreciarse en las figuras citadas, la presencia de GδL es fácilmente detectada en virtud de su Rf y coloración típica - frente al reactivo de bencidina (color amarillo). Corresponde a la que se designa en los cromatogramas con el número 1 (ver figuras 18 a 22).

La figura 23 corresponde a una fotografía de dos cromatogramas en capa fina de sílica gel G-60 de extractos de chorizo que nos permite apreciar la situación de la mancha correspondiente a la GδL y la de algunos carbohidratos que, al menos teóricamente, pueden aparecer en

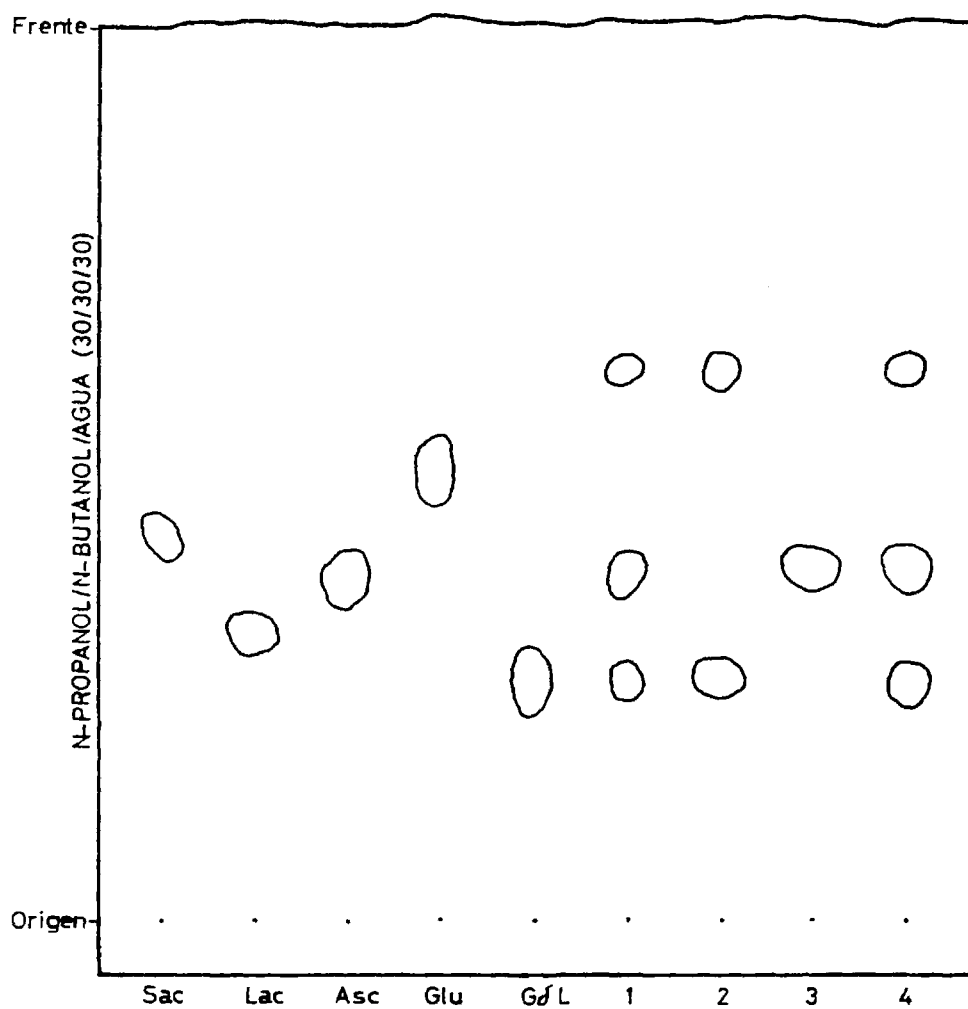


FIGURA 18: CROMATOGRAMA EN CAPA FINA DE SILICA GEL G-60 DE LOS EXTRACTOS PROCEDENTES DE CUATRO MUESTRAS DIFERENTES DE SALAMIS (1-4), Y DE PATRONES DE SACAROSA (Sac), LACTOSA (Lac), ACIDO ASCORBICO(Asc), GLUCOSA (Glu) Y GLUCONO- δ -LACTONA (GdL).

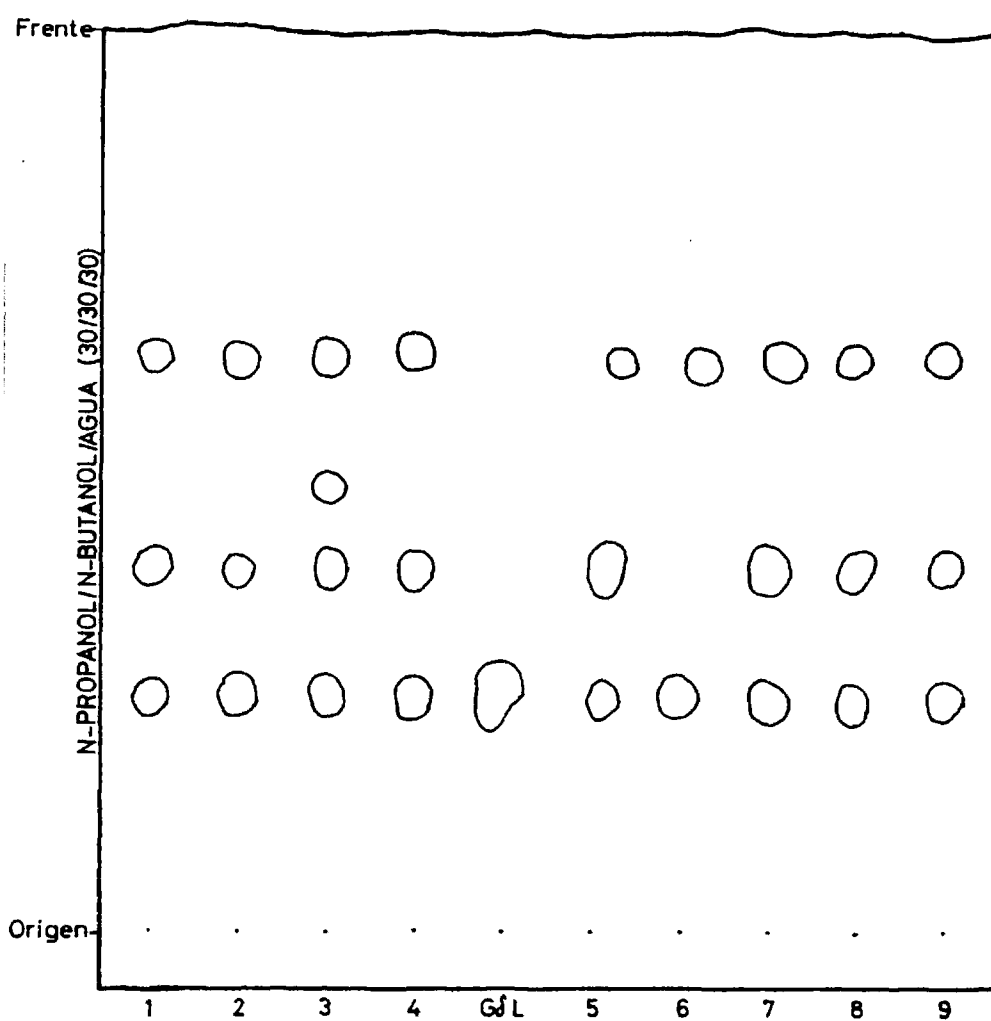


FIGURA 19: CROMATOGRAMA EN CAPA FINA DE SILICA GEL G-60 DE LOS EXTRACTOS PROCEDENTES DE NUEVE MUESTRAS DIFERENTES DE CHORIZOS (1-9) JUNTO CON UN PATRON DE GLUCONO- δ -LACTONA (GdL).

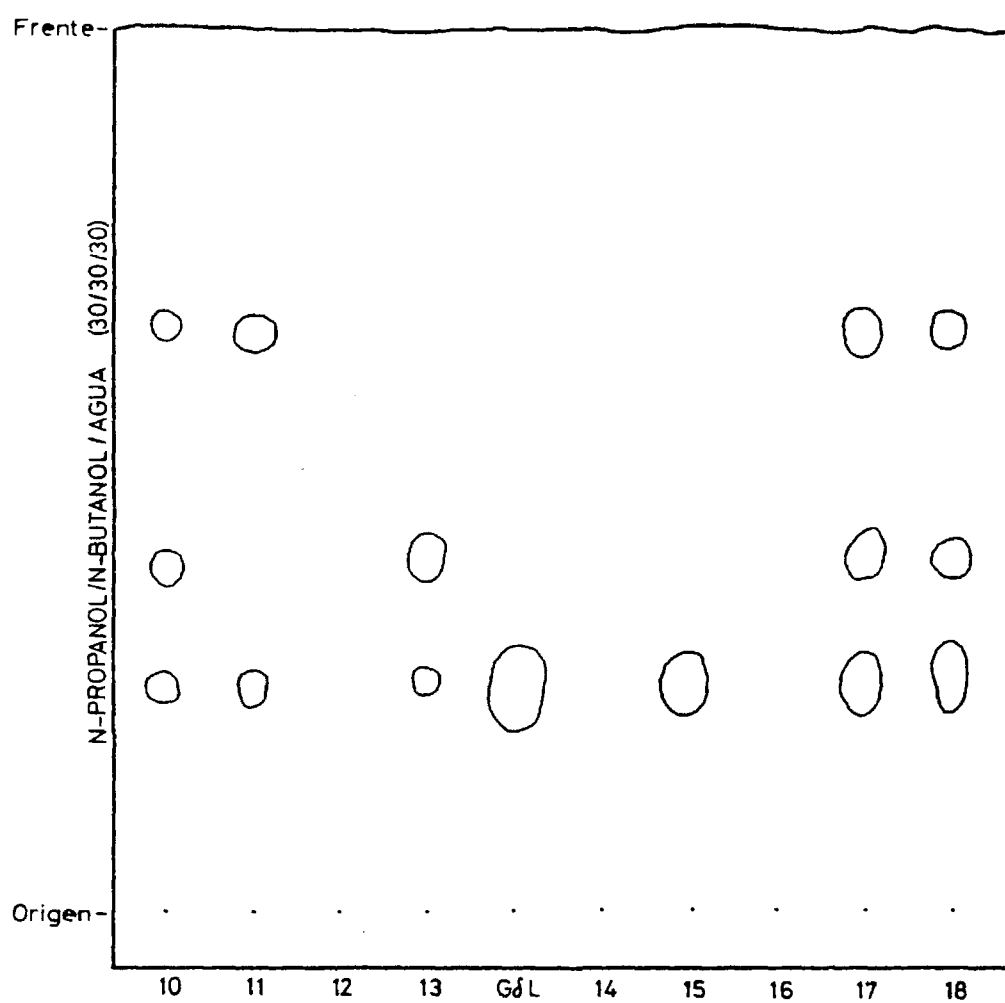


FIGURA 20: CROMATOGRAMA EN CAPA FINA DE SILICA GEL G-60 DE LOS EXTRACTOS PROCEDENTES DE NUEVE MUESTRAS DIFERENTES DE CHORIZOS (10-18) JUNTO CON UN PATRON DE GLUCONO- δ -LACTONA (GdL).

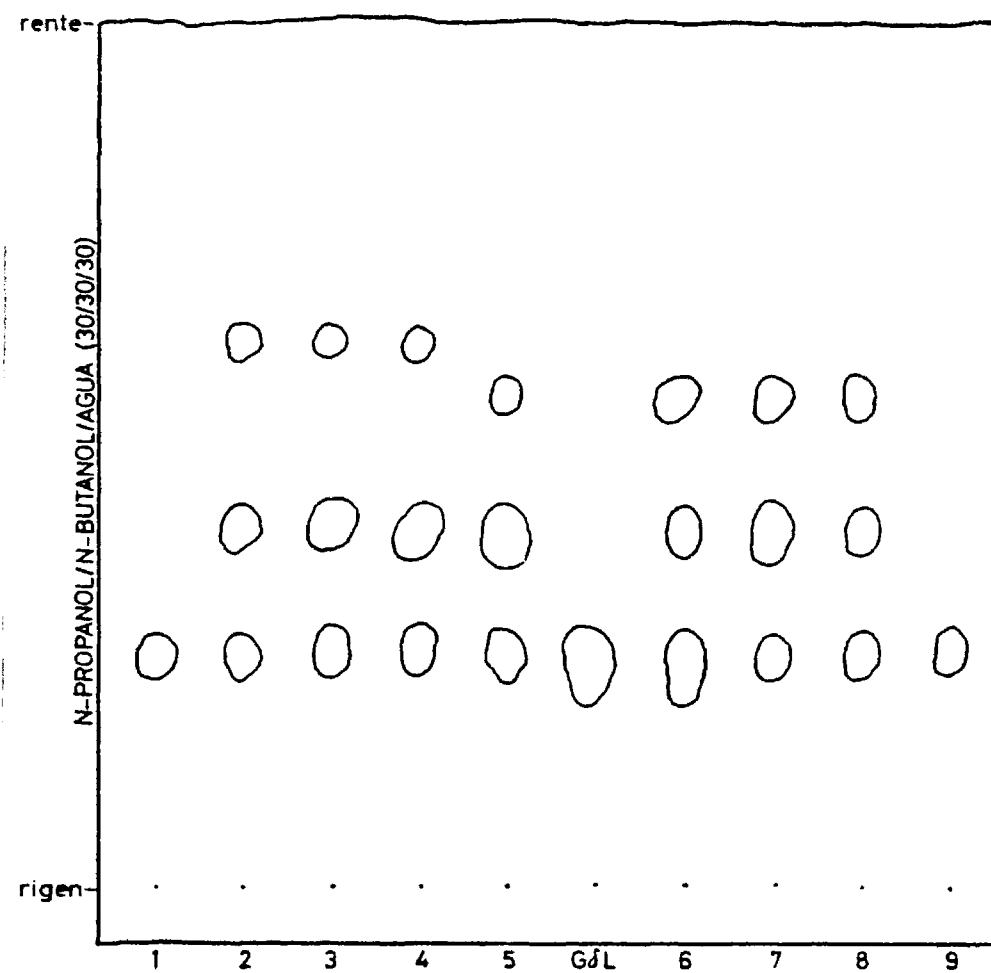


FIGURA 21: CROMATOGRAMA EN CAPA FINA DE SILICA GEL G-60 DE LOS EXTRACTOS PROCEDENTES DE NUEVE MUESTRAS DIFERENTES DE SALCHICHONES - (1-9) JUNTO CON UN PATRON DE GLUCONO- δ -LACTONA (GdL).

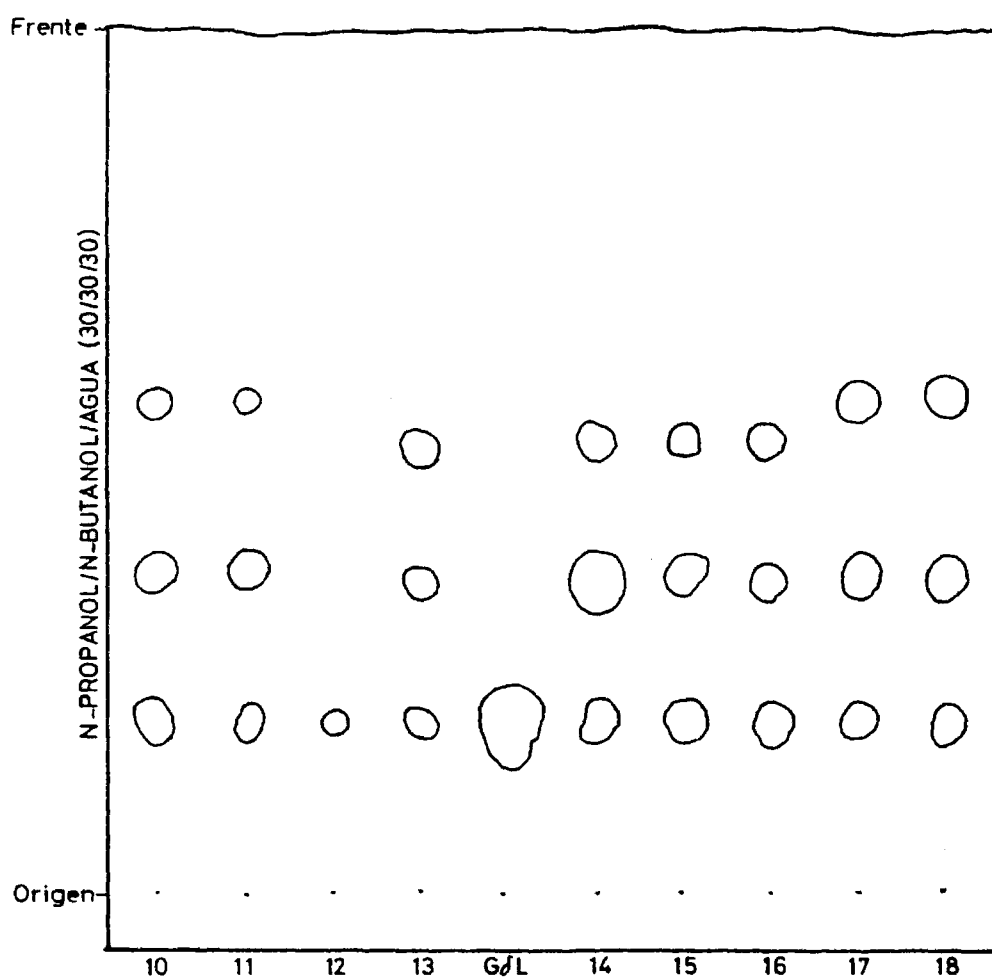


FIGURA 22: CROMATOGRAMA EN CAPA FINA DE SILICA GEL G-60 DE LOS EXTRACTOS PROCEDENTES DE NUEVE MUESTRAS DIFERENTES DE SALCHICHONES - (10-18) JUNTO CON UN PATRON DE GLUCONO- δ -LACTONA (G/L).

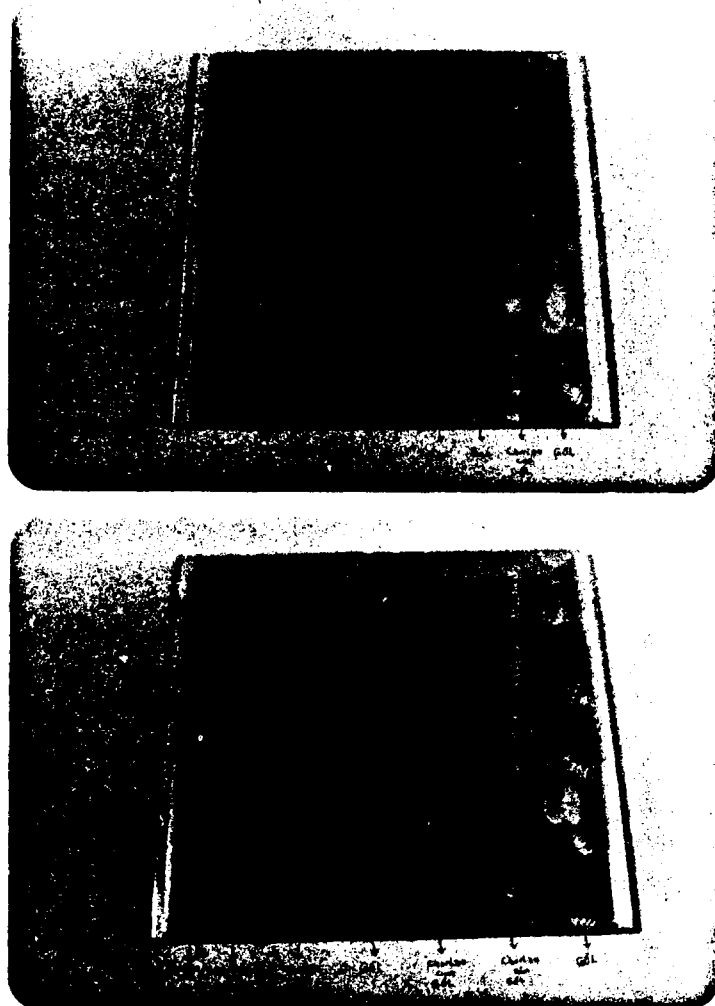


Figura 23: Ejemplos de cromatografía en capa fina de diversos patrones y muestras. En algunos puede observarse la presencia de $G\delta L$ y en otros no. (La mancha correspondiente a la $G\delta L$ fue de color amarillo, mientras que las restantes eran de color blanco). $G\delta L$: glucono- δ -lactona; Asc: ácido ascórbico; Lac: lactosa y Sac: sacarosa.

algunos embutidos.

Como puede apreciarse en las figuras 18 a 22, además de la GδL, se pusieron de manifiesto otra serie de manchas cuyos Rfs. eran mayores que los de aquella y que mostraron una reacción negativa (color blanco) a la bencidina. Aunque no intentamos la identificación de estas sustancias, como puede observarse en las figuras citadas, presentaron un Rf similar al de otros hidratos de carbono cromatografiados en otras ocasiones (ver figura 23, fotografía superior). Sin lugar a dudas se trata de hidratos de carbono, pero su identificación precisa requeriría otro tipo de cromatografía, por ejemplo, desarrollo en papel Whatman - Nº 1 con n-butanol/piridina/agua (6/4/3) (v/v/v) y revelado con reactivo de Schiff y nitrato de plata (véase Ordóñez, 1974).

La tabla VI indica la frecuencia con que aparece GδL en las muestras analizadas. En todas las muestras de salchichón se detectó este aditivo y en la mayor parte de las de salami y chorizo. En total, en un 90% de las muestras se pudo detectar GδL.

Llama poderosamente la atención el que en el 100% de las muestras de salchichón estudiadas aparezca GδL, mientras que en el salami el porcentaje de los positivos a este producto es del 75%, situándose en un término medio (83%) los correspondientes al chorizo.

Los productos procedían de fábricas situadas en 15 provincias repartidas por toda la geografía española.

El nivel de incidencia de la GδL, reveló que es un aditivo - ampliamente utilizado. Las muestras donde no se detectó GδL procedían de fábricas localizadas en las provincias de Madrid, Huelva, Vizcaya y Toledo. No obstante, otras fábricas de estas provincias utilizan también GδL para acelerar la maduración de los embutidos que elaboran.

TABLA VI

Resultados de la determinación de glucono- δ -lactona, obtenidos de las cromatografías de los extractos procedentes de muestras de salami, chorizo y salchichón de diversas marcas comerciales.

Tipo de muestra.	Número de marcas.	Número de muestras.	Marcas con G δ L (%).	Marcas sin G δ L (%).
Salami	4	16	3 (75%)	1 (25%)
Chorizo	18	72	15 (83,3%)	3 (16,6%)
Salchichón	<u>18</u>	<u>72</u>	<u>18 (100%)</u>	<u>0 (0%)</u>
Total:	40	160	36 (90%)	4 (10%)

IV.3.1.2. Prueba de degustación.

Aunque acerca del papel de la GδL en la aparición y persistencia del color de los productos cárnicos curados no existe total acuerdo (Acton y Dick, 1977), según uno de los técnicos de la fábrica española que elaboró alguno de los chorizos analizados (ver página 144), la GδL, puede inicialmente favorecerlo, pero con el transcurso del tiempo tiene una acción contraria (decolora). También algunos miembros de este Departamento sostenían que el sabor del chorizo con GδL era ligeramente amargo y distinto del típico de este producto.

En consecuencia se hizo un intento de diferenciar los embutidos madurados mediante adición de GδL y los curados de forma natural por sus propiedades organolépticas más características.

En primer lugar se observó su aspecto externo y al corte tras dos meses de su maduración. En la figura 24 puede apreciarse el aspecto al corte del chorizo tratado con GδL y del carente de este aditivo. No pudo observarse diferencia alguna en el aspecto al corte (fotografía inferior). Sin embargo, en el aspecto externo de los embutidos madurados con GδL se apreciaba una mayor retracción de la tripa (fotografía superior), que se hacía más aparente con el transcurso del tiempo.

Acton y Dick (1977), sostienen que la desecación de los productos cárnicos disminuye la concentración del pigmento de "carne curada" en su superficie y Townsend (1973) señala que en los embutidos - cuyo contenido de humedad es del 25-30% la conversión del grupo hemo en el correspondiente derivado óxido nítrico es menor que en los que poseen humedades en torno al 45-60%.

Un jurado compuesto por 12 catadores seleccionados entre el personal del Departamento elaboró primero un baremo de la contribución



Figura 24: Aspectos externo y al corte de chorizos madurados con y sin glucono- δ -lactona. Las muestras de la parte superior de cada fotografía corresponden a embutidos madurados sin glucono- δ -lactona y la inferior a embutidos adicionados de este aditivo.

de cada una de las características organolépticas más importantes (sabor, olor, color, consistencia, dureza inicial y dureza final) a la calidad global del embutido.

En la tabla VII se muestra la marcha seguida para elaborar el baremo.

Se prepararon 4 lotes de otros tantos embutidos de los que dos (lotes 2 y 3) contenían G δ L y otros dos (lotes 1 y 4) estaban exentos de este aditivo.

Cada uno de los componentes del jurado valoró luego, sobre 10 puntos, cada una de las propiedades organolépticas citadas de los cuatro lotes. En las tablas VIII, IX, X y XI, se muestran los valores obtenidos por cada característica organoléptica en las cuatro pruebas de degustación efectuadas.

La tabla XII, recoge la puntuación total de cada propiedad organoléptica, sobre 100 puntos, otorgada por el jurado a cada lote de embutidos y la calificación global alcanzada sumando los productos obtenidos de multiplicar la puntuación de cada propiedad por el factor con que el jurado había decidido que contribuía a la calidad final del chorizo (véase tabla VII).

Como puede observarse en la tabla XII a los dos meses de fabricado el chorizo, la calidad organoléptica de los elaborados con G δ L es menor que la de los que carecían de este aditivo, lo que parece contradecir la afirmación de Acton y Dick (1977) quienes señalan que la producción de pigmento es mayor en los embutidos que contienen gluconolactona que los que carecen de este producto. A este respecto conviene tener presente que la presencia de pimentón en los chorizos debe, de alguna manera, influir en el color final de los mismos. Sin embargo, -

TABLA VII

Barremo elaborado por el jurado de catadores de la contribución de las propiedades organolépticas a la calidad.

Catador	Sabor	Olor	Color	Consistencia	Dureza inicial	Dureza final	Total
Nº 1	6,5	0,5	1,0	0,8	0,6	0,6	10
" 2	5,5	1,0	1,5	1,0	0,5	0,5	10
" 3	6,0	1,0	1,0	0,5	0,7	0,8	10
" 4	4,0	2,0	1,0	2,0	0,5	0,5	10
" 5	5,0	1,5	1,0	1,0	0,8	0,7	10
" 6	5,0	2,0	0,8	0,8	0,7	0,7	10
" 7	4,0	0,5	2,0	1,5	1,0	1,0	10
" 8	6,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	10
" 9	4,0	1,0	1,5	1,5	1,0	1,0	10
" 10	5,0	0,5	1,5	1,0	1,0	1,0	10
" 11	5,5	1,2	1,2	1,0	0,5	0,6	10
" 12	4,0	1,0	2,0	2,0	0,5	0,5	10
MEDIA	5,04	1,10	1,29	1,18	0,69	0,70	10
Factor contribución a calidad final.....	0,504	0,110	0,129	0,118	0,069	0,070	1,0

TABLA VIII

Valoración de cada una de las características organolépticas del lote de chorizo N° 1, elaborado sin glucono- δ -lactona.

Catador	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Media
Sabor	4	4	8	8	6	6	8	6	6	4	6	10	6,33
Olor	8	6	8	8	8	8	8	6	10	8	8	8	7,83
Color	6	6	10	10	8	8	6	6	8	8	4	8	7,33
Consistencia.	6	4	2	6	6	8	6	4	8	4	4	8	5,50
Dureza inicial.	6	4	6	8	4	4	4	6	8	8	10	8	6,33
Dureza final.	4	2	4	6	4	6	6	2	8	4	8	8	5,16

TABLA IX

Valoreación de cada una de las características organolépticas del lote de chorizo N° 2, elaborado con glucono- δ -lactona.

Catador	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Media
Sabor	2	4	6	6	4	2	6	2	4	4	4	4	4,00
Olor	6	4	10	6	4	4	4	4	8	4	8	4	5,50
Color	4	4	6	6	6	4	6	4	6	2	6	6	5,00
Consistencia.	6	4	2	6	6	2	4	2	6	4	4	6	4,33
Dureza inicial.	4	6	4	6	6	6	6	4	4	6	8	4	5,33
Dureza final.	6	4	4	6	4	2	6	2	6	6	6	6	4,83

TABLA X

Valoración de cada una de las características organolépticas del lote de chorizo N° 3, elaborado con glucono- δ -lactona.

Catador	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Media
Sabor	2	4	6	6	6	4	6	2	4	8	2	6	4,66
Olor	4	4	8	8	8	4	4	6	6	6	2	6	5,50
Color	2	6	8	6	8	4	4	4	4	4	4	6	5,00
Consistencia.	2	6	6	4	4	4	6	2	6	4	6	6	4,66
Dureza inicial.	4	6	6	8	4	6	4	4	4	8	6	4	5,33
Dureza final.	6	4	6	6	4	2	6	2	6	8	4	6	5,00

TABLA XI

Valoración de cada una de las características organolépticas del lote de chorizo Nº 4, elaborado sin glucono- δ -lactona.

Catador	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Media
Sabor	4	6	4	8	8	6	8	6	6	6	4	8	6,16
Olor	4	8	8	6	6	8	6	6	8	6	4	8	6,50
Color	8	4	10	6	8	6	6	6	6	8	6	6	6,66
Consistencia.	4	6	8	8	6	6	4	4	6	6	4	8	5,83
Dureza inicial.	6	2	8	8	6	6	4	4	6	6	6	8	5,83
Dureza final.	2	2	6	6	6	6	6	4	6	6	6	8	5,33

TABLA XII

Puntuación total de cada propiedad organoléptica y calificación -
global de cada lote de chorizo.

Propiedad organoléptica	Lote de Chorizo			
	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4
	Puntuación sobre 100			
Sabor	63,33	40,00	46,66	61,66
Olor	78,33	55,00	55,00	65,00
Color	73,33	50,00	50,00	66,66
Consistencia	55,00	43,33	46,66	58,33
Dureza inicial	63,33	53,33	53,33	58,33
Dureza final	51,66	48,33	50,00	53,33
Calidad organoléptica global.....	64,47	44,84	48,70	61,47

los autores citados, contrariamente a lo sostenido por Sair y Henry - (1967) terminan afirmando que la G δ L no contribuye a la estabilidad - del color de los embutidos.

Duda y col. (1976) también son de la opinión de que la G δ L no influye ni en la formación de pigmento, ni en la estabilidad del formado en el producto final.

Schiavello y col. (1975) trabajando con salami tipo "Varzi" - comprobaron que el sabor de este embutido era mejor en ausencia que en presencia de G δ L.

A la vista de nuestros resultados debe concluirse afirmando que en el caso del chorizo de G δ L dista mucho de mejorar los carácte-res organolépticos del chorizo, que se mantiene en desecación dos o más meses, aunque facilita su maduración inicial al acortar el tiempo requer-rido para el descenso del pH a los valores a que se inician los cambios madurativos típicos; en torno a 5,9-5,7 de acuerdo con Rodríguez García de la Torre (1972).

IV.3.2. Proteínas de soja.

Los productos cárnicos en los que se estudió la presencia de proteínas de soja fueron salchichas tipo "Frankfurt" de 15 marcas comer-ciales distintas (números 1-15 de la tabla XIII) y 9 marcas distintas de mortadela (números 1-9 de la tabla XIV); de las salchichas analiza-das, tres eran de importación de Alemania Federal. En total se examina-ron 128 muestras que se obtuvieron según se describe en II.3.1.2.

IV.3.2.1. Detección de proteínas de soja.

La detección de proteínas de soja en las muestras anteriormen-te mencionadas se realizó siguiendo el método electroforético de Homa-

younfar (1975) con una serie de modificaciones deducidas de nuestras experiencias.

Debido a que al llevar a cabo la electroforesis de los extractos de productos cárnicos frescos o pasteurizados se forman numerosas bandas proteicas entre las cuales es difícil distinguir las específicas de la soja, se recomienda la esterilización o tratamiento térmico de dichas muestras antes de su análisis electroforético.

El tratamiento térmico persigue el eliminar las posibles interferencias y poder así distinguir fácilmente las bandas correspondientes a las proteínas de soja, gracias a que las vegetales son menos sensibles a la desnaturalización por el calor que las animales.

Una vez calentadas las muestras sus extractos se obtuvieron mediante precipitación proteica, extracción de los lípidos, desecación y solubilización proteica (véase IV.2.2.).

La electroforesis sobre gel de poliacrilamida al 7,5% se realizó en todos los casos con alícuotas de 50 μ l. de dichos extractos y con un tiempo de migración del orden de 80-90 minutos. Tanto en la solubilización de las proteínas, como en la preparación de los geles, se usó urea a concentración 8M, que permitía una mejor solubilización proteica y una mejor separación electroforética de las bandas.

Para la tinción de los geles se usó el colorante de azul-negro anilina.

Primeramente se aplicó esta técnica a tres muestras sin calentar de carne de vacuno, proteína "aislada" de soja y una mezcla de carne y proteína de soja al 10%; con el fin de ver la movilidad electroforética de sus componentes.

La figura 25 es una fotografía de las bandas electroforéticas



Figura 25: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5% de los extractos obtenidos de muestras, no sometidas a tratamiento térmico, de proteína "aislada" de soja (1), de carne de vacuno (3) y de una mezcla de ambas (2).

en gel de poliacrilamida al 7,5% obtenidas con los extractos proteicos de dichas muestras. Como puede apreciarse en la mezcla de carne y soja es imposible distinguir cuales son las bandas características de las proteínas de soja.

En la figura 26 se aprecian los trazados densitométricos y los diagramas correspondientes, de una muestra de carne (C) y otra de proteína "aislada" de soja (S) que, se sometieron a electroforesis independientemente y sin haber sufrido tratamiento térmico alguno. Como puede apreciarse es prácticamente imposible diferenciarlas, dado que sus velocidades de migración son muy similares, como lo demuestra la coincidencia de sus trazados (ver parte superior de la figura 26).

La soja presenta seis bandas muy características de las cuales dos son muy intensas. Por otro lado, la carne presenta ocho bandas. Además, en el trazado electroforético de la carne de vacuno se observa una banda, a la que corresponde la máxima migración que no aparece nunca en el de la proteína "aislada" de soja.

Se analizaron además, unas muestras de salchichas tipo "Frankfurt" sin esterilizar y no se pudieron identificar las bandas de las proteínas de soja.

En consecuencia, tanto las muestras de carne, como las de soja y una mezcla de ambas se sometieron a calentamiento en autoclave de acuerdo con las condiciones recomendadas por dicho método (117°C durante 75 minutos); cuando sus extractos se sometieron a electroforesis, - tanto las bandas de las proteínas de soja como las de la carne desaparecieron (véase figura 27).

A la vista de estos resultados, estas tres muestras se sometieron a una serie de tratamientos térmicos (en autoclave, baño maría

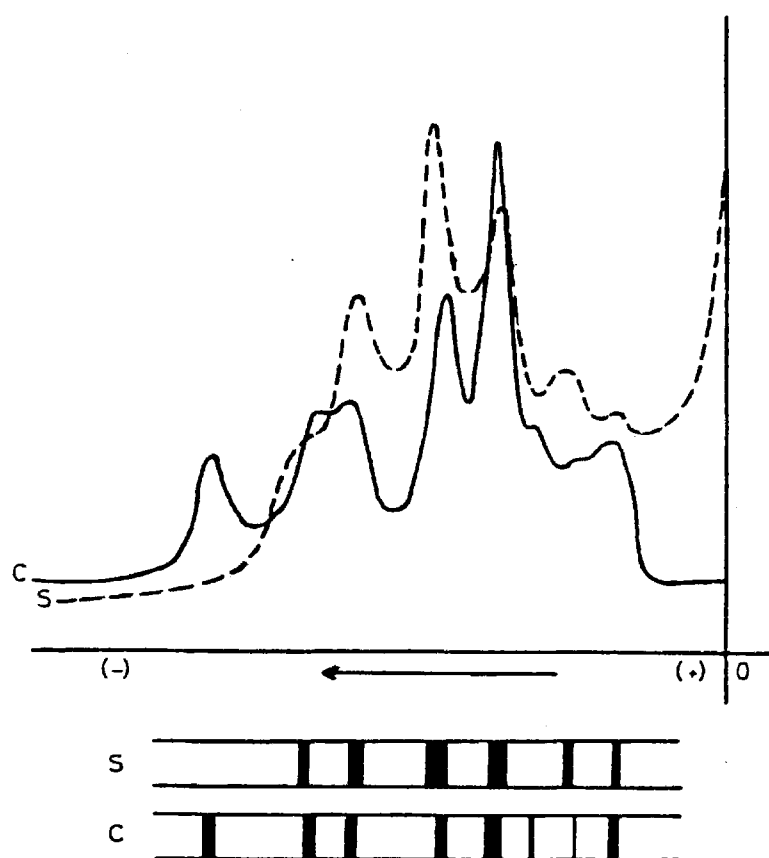


FIGURA 26: TRAZADOS DENSITOMETRICOS Y DIAGRAMAS ESQUEMATICOS DE LAS ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 7,5% OBTENIDAS DE LAS PROTEINAS EXTRAIDAS EN UREA 8M; S: DE PROTEINA "AISLADA" DE SOJA Y C: DE CARNE DE VACUNO, AMBAS SIN PREVIDO TRATAMIENTO TERMICO.



Figura 27: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5% de los extractos obtenidos de muestras, sometidas a tratamiento térmico en autoclave a 117°C durante 75 minutos, de proteína "aislada" de soja (1), carne de vacuno (3) y de una mezcla de ambas (2).

y baño de glicerina) a distintas temperaturas y tiempos, con el fin de buscar la temperatura y el tiempo óptimos para que las bandas de las - protefínas cárnicas desaparecieran antes que las de soja.

En primer lugar, se calentaron todas las muestras en autoclave a una atmósfera de presión (121°C aproximadamente) utilizando los siguientes tiempos: 80, 70, 50, 45, 30 y 20 minutos. A continuación, los correspondientes extractos se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida, como queda dicho, observándose que a los 80, 70, 50, 45 y 30 minutos de calentamiento a una atmósfera, desaparecieron todas las bandas, mientras que las muestras que sufrieron solo dicho tratamiento durante 20 minutos, mostraban en sus electroforesis apenas unas bandas muy difusas difíciles de distinguir.

Dado que en los autoclaves era difícil de controlar el verdadero tratamiento térmico que estas muestras sufrían al desconocerse la temperatura del "tiempo de espera" se pasó a utilizar baños de agua a ebullición.

En dichos baños se mantuvieron las muestras durante tiempos que oscilaron entre 15 y 80 minutos. Sometidos a electroforesis los extractos correspondientes, en todos los casos se apreciaron las bandas características de la carne y de la soja, siendo imposible distinguir en la mezcla de ambas las bandas que correspondían a la soja por lo que se dedujo que el tratamiento térmico resultaba insuficiente.

Por otro lado, el baño maría presenta el inconveniente de que su temperatura no supera la de ebullición del agua (98°C. aproximadamente), por lo que se utilizó un baño de glicerina termostataado a diversas temperaturas y tiempos.

En el baño de glicerina regulado a 100°C. se mantuvieron las

muestras durante varios períodos de tiempo: 80, 100, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 360, 420 y 480 minutos.

Mientras que en las muestras mantenidas de 80 hasta 270 minutos se podían apreciar claramente tanto las bandas de las proteínas de la carne como las de la soja, a partir de los 300 minutos comenzaban a desaparecer las bandas correspondientes a la carne persistiendo en cambio, las de la soja. Este período de tiempo sería, por lo tanto, el adecuado para cuando se utiliza una temperatura de 100°C. Después de 480 minutos de tratamiento térmico desaparecen completamente todas las bandas correspondientes a la carne.

La figura 28 muestra dos fotografías donde se pueden observar los resultados de las electroforesis en geles de poliacrilamida de los extractos de muestras de carne sola y de soja sola tratadas a 100°C durante varios períodos de tiempo. Como puede observarse, las proteínas de soja son más resistentes al tratamiento térmico que las proteínas cárnicas.

Es necesario señalar como muestran estos electroforegramas, - que el calentamiento no tiene ningún efecto sobre la posición de las bandas, pero sí sobre la nitidez de las mismas las cuales van desapareciendo a medida que aumenta la temperatura o el tiempo de calentamiento, detalle que también ha sido observado por Hofmann (1977).

Como este tiempo (300 minutos) es demasiado largo y convierte el método en tedioso por el tiempo total requerido para el análisis rutinario de las muestras, se incrementó la temperatura del baño de glicerina a 110°C. aplicando los siguientes tiempos: 120, 150 y 180 minutos.

A los 120 minutos aparecían las bandas características de am-

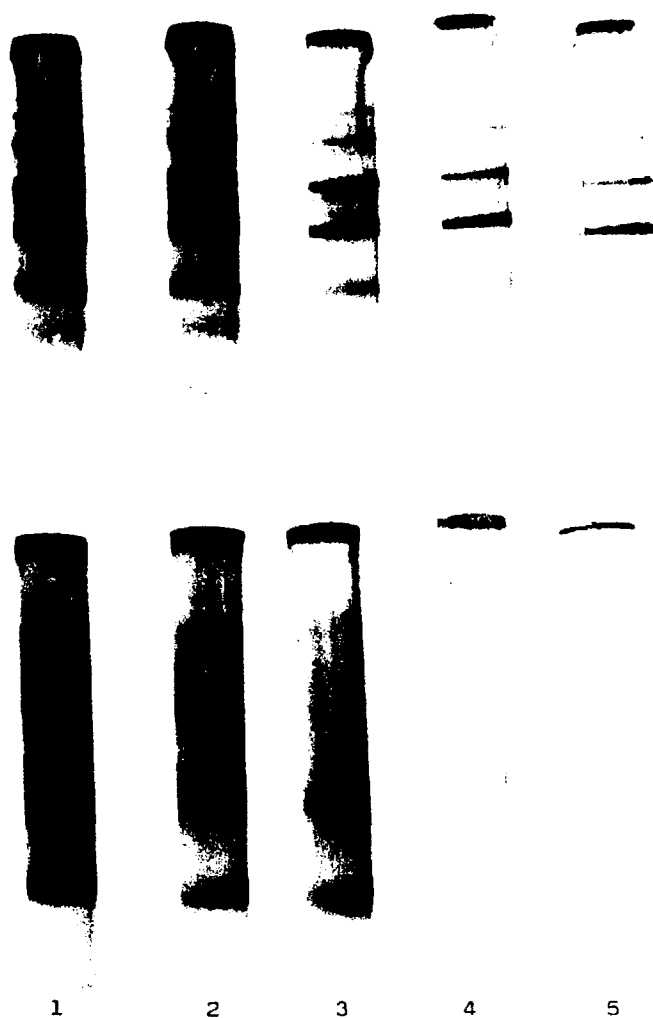


Figura 28: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5% de los extractos obtenidos de muestras de proteína "aislada" de soja (fotografía superior) y de carne de vacuno (fotografía inferior), sometidas a tratamiento térmico en baño de glicerina a 100°C durante diversos tiempos: 120 (1), 180 (2), 240 (3), 300 (4) y 420 (5) minutos.

bas proteínas y a los 150 minutos comenzaban a desaparecer las correspondientes a la carne mientras que persistían las de la soja alcanzándose así los mismos resultados que a 100°C durante 300 minutos.

Por último, se aumentó la temperatura del baño de glicerina a 120°C aplicando los siguientes tiempos: 15, 30, 45 y 60 minutos.

A los 15 y 30 minutos aparecían muy claras las bandas de ambas proteínas, siendo imposible diferenciarlas en la mezcla, mientras que a los 45 minutos las bandas correspondientes a la carne comenzaban a desaparecer y a los 60 minutos de tratamiento térmico ya se podían diferenciar perfectamente en una mezcla las bandas originadas por la soja de las de la carne.

La figura 29, es una fotografía de electroforegramas de una mezcla de carne de vacuno y proteína "aislada" de soja (10%) calentada a 120°C durante una hora (A); de carne de vacuno sola que sufrió el mismo tratamiento (B), y de la misma mezcla que no se sometió a tratamiento térmico alguno (C).

Como puede apreciarse el tratamiento a 120°C durante una hora de la mezcla de carne de vacuno y proteína "aislada" de soja permite observar con nitidez las bandas típicas de la soja. Por consiguiente a partir de este momento se utilizó en todas las muestras de salchichas tipo "Frankfurt" y mortadelas analizadas el tratamiento citado.

El porcentaje mínimo de proteína "aislada" de soja que se puede detectar por esta técnica en mezclas de carne y soja es un 5%. El color de las bandas electroforéticas de la soja aumenta de intensidad a medida que lo hacen las concentraciones de soja de las mezclas.

En la tabla XIII, se recogen los resultados obtenidos de las electroforesis de los extractos de las muestras de salchichas tipo -

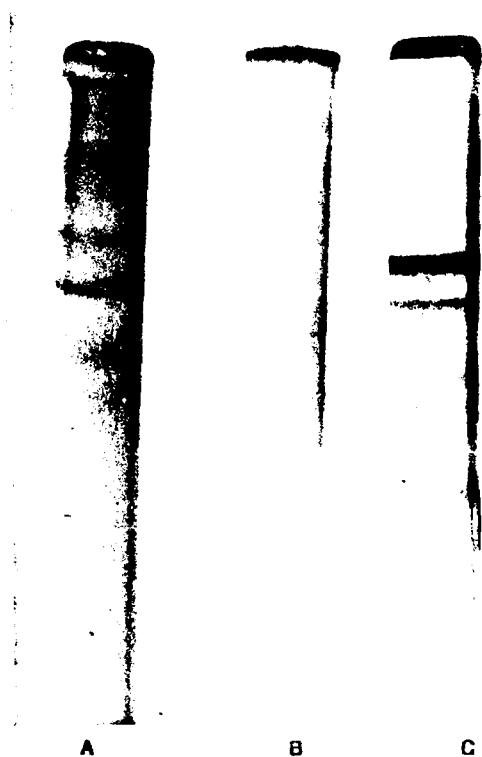


Figura 29: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5% de los extractos obtenidos de muestras de una mezcla de carne de vacuno y proteína "aislada" de soja (10%) calentadas en baño de glicerina a 120°C durante una hora (A); de carne de vacuno sola que sufrió el mismo tratamiento (B), y de la misma mezcla que no se sometió a tratamiento térmico alguno (C).

TABLA XIII

Resultados de la detección de proteínas de soja, obtenidos de las electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5% de los extractos procedentes de muestras de salchichas tipo "Frankfurt" de diversas firmas comerciales.

Marca comercial	Número de muestras (1)	Bandas proteicas de soja.
1	6	-
2	5	+
3	6	-
4	6	-
5	5	+
6	5	+
7	6	+
8	5	+
9	5	+
10	5	+
11	6	-
12	5	+
13	5	+
14	5	+
<u>15</u>	<u>5</u>	<u>+</u>
Total: 15	80	11 + (73,33%)

+ = presencia.

- = ausencia.

(1) Cada muestra se analizó por triplicado.

"Frankfurt" estudiadas.

De las 15 marcas de salchichas analizadas salvo en cuatro de ellas (números 1, 3, 4 y 11), en todas se detectó la presencia de las bandas características de las proteínas de soja, es decir en un 73,3%.

De las tres marcas de salchichas alemanas analizadas (números 10, 11 y 12) sólo una, la número 11, no presentó las bandas características de la soja.

Como puede apreciarse en la fotografía de la figura 30, los electroforegramas de las salchichas tipo "Frankfurt" que presentan proteína de soja y las que carecen de esta sustancia son fácilmente distinguibles, la parte izquierda de la fotografía representa el electroforegrama de una salchicha en cuya composición entraba la proteína de soja. Comparese con el de la derecha que corresponde a una salchicha que carece de este aditivo.

En la tabla XIV se recogen los resultados obtenidos al someter a electroforesis, siguiendo nuestra técnica, los extractos de las muestras de mortadelas analizadas.

De las 9 marcas de mortadelas estudiadas, en ocho se detectó la presencia de proteína de soja, es decir en un 88,8%.



1

2

Figura 30: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5% de los extractos obtenidos de dos muestras de salchichas tipo "Frankfurt": una con proteína de soja (1) y otra sin proteína de soja (2), después de calentadas en baño de glicerina a 120°C durante una hora.

TABLA XIV

Resultados de la detección de proteínas de soja, obtenidos de las electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5% de los extractos procedentes de muestras de mortadelas de diversas firmas comerciales.

Marca comercial.	Número de muestras (1).	Bandas proteicas de soja.
1	6	-
2	5	+
3	6	+
4	5	+
5	5	+
6	5	+
7	6	+
8	5	+
9	5	+
Total: 9	48	8 + (88,88 %)

+ = presencia.

- = ausencia.

(1) Cada muestra se analizó por triplicado.

IV.3.3. Almidón.

Los productos cárnicos utilizados con el fin de estudiar el grado de incidencia de almidón en los mismos, estuvieron constituidos por mortadelas (marcas 1-5 de la tabla XV) y salchichas tipo "Frankfurt" (marcas 1-15 de la tabla XVI), de doce firmas comerciales españolas y tres alemanas. Todas las muestras aparecían como productos envasados, según se describe en II.3.1.2.

IV.3.3.1. Detección de almidón.

Con las muestras anteriormente mencionadas y previamente a su análisis cuantitativo, se llevó a cabo una estimación cualitativa, basada en la reacción del almidón con el yodo (solución de Lugol). Dicha reacción se consideró positiva cuando tenía lugar la aparición de una coloración azul-negra en el líquido.

En las tablas XV y XVI se recogen los resultados obtenidos.- En el 100% de las marcas de mortadelas estudiadas se detectó la presencia de almidón, mientras que en las salchichas siempre una dió reacción dudosa y tres fueron negativas. El 73,3% de las salchichas presentaban almidón. Las intensidades del color que se apreciaron fueron distintas, variando desde azul-negro muy intenso (+ + +), hasta azul-negro tenue (+), pasando por una coloración intermedia (+ +).

IV.3.3.2. Niveles de almidón.

La glucosa resultante al hidrolizar el almidón con ácido perclórico se sometió a la acción de los reactivos de antrona y fenol (véase IV.2.3.2.). El contenido en glucosa obtenido para cada una de las muestras analizadas se recoge en las tablas XVII y XVIII.

TABLA XV

Resultados obtenidos de la detección de almidón en muestras de varias marcas españolas de mortadelas (1-5), mediante el reactivo de Lugol.

Marca comercial.	Número de muestras (1).	Reacción
1	7	+
2	6	+ +
3	6	+ + +
4	6	+ + +
<u>5</u>	<u>7</u>	<u>+</u>
Total: 5	32	5 positivas (100%).

+ + + = azul-negro intenso.

- = reacción negativa.

+ + = azul-negro.

? = reacción dudosa.

+ = azul-negro tenue.

(1) Cada muestra se analizó por triplicado.

TABLA XVI

Resultados obtenidos de la detección de almidón en muestras de varias firmas comerciales de salchichas tipo "Frankfurt" (1-15), mediante el reactivo de Lugol.

Marca comercial.	Número de muestras (1).	Reacción.
1	7	+
2	7	+
3	6	++
4	6	+++
5	6	+++
6	6	++
7	7	+
8	7	-
9	7	?
10	6	++
11	6	+++
12	6	+++
13	7	-
14	7	-
15	7	+
Total: 15	98	11 positivas (73,33%).

+++ = azul-negro intenso.

++ = azul-negro.

+ = azul-negro tenue.

- = reacción negativa.

? = reacción dudosa.

(1) Cada muestra se analizó por triplicado.

TABLA XVII

Niveles de almidón en muestras de varias marcas españolas de mortadelas (1-5) (valores expresados en g/100g. de muestra).

Marca comercial.	Número de muestras (1).	Método de Glover		Método de Dubois	
		Glucosa	Almidón	Glucosa	Almidón
1	6	4,40	4,66	4,40	4,66
2	6	5,55	5,88	5,10	5,41
3	6	12,90	13,67	12,45	13,20
4	6	6,25	6,63	6,30	6,68
<u>5</u>	<u>6</u>	4,05	4,29	3,60	3,82
Total: 5	30				

(1) Cada muestra se analizó por triplicado.

TABLA XVIII

Niveles de almidón en muestras de varias firmas comerciales de salchichas tipo "Frankfurt" (1-15) (valores expresados en g/100g de muestra).

Marca comercial.	Número de muestras (1).	Método de Glover		Método de Dubois	
		Glucosa	Almidón	Glucosa	Almidón
1	6	4,25	4,51	4,10	4,35
2	6	3,60	3,82	2,50	2,65
3	6	5,45	5,78	5,40	5,72
4	6	6,00	6,36	7,45	7,90
5	6	6,95	7,38	7,30	7,74
6	6	4,95	5,25	4,90	5,19
7	6	3,70	3,92	3,20	3,39
8	7	0,20	0,21	0,15	0,15
9	7	0,90	0,95	0,95	1,00
10	6	4,50	4,77	3,20	3,39
11	6	6,75	7,16	6,10	6,47
12	6	7,35	7,79	7,20	7,63
13	7	0,60	0,64	0,55	0,58
14	7	0,45	0,48	0,40	0,44
<u>15</u>	<u>6</u>	2,60	2,76	1,90	2,01
Total:15	94				

(1) Cada muestra se analizó por triplicado.

Como puede apreciarse, tanto en mortadelas como en salchichas, las tasas de almidón halladas con ambos métodos son similares; se separan de estos niveles las salchichas de las marcas 2, 4, 10 y 15, cuya concentración de almidón presenta resultados algo dispares.

Como conclusión, puede señalarse que el método de Dubois y - col. (1956) podría desplazar al de Glover y col. (1966) en los análisis de inspección rutinarios, por su rapidez y dado que la estabilidad de la reacción colorimétrica es mayor. Respecto a la sensibilidad de ambos métodos, podría concluirse que es similar, según se deriva de las gráficas patrones (véase figuras 15 y 16).

Un análisis de las tablas XVII y XVIII permite deducir que todas las muestras contenían almidón aunque a niveles variables. En cuatro de ellas (marcas 8, 9, 13 y 14 de la tabla XVIII) el porcentaje de almidón era igual o inferior al 1%. Comparando estas tablas con las XV y XVI se aprecia que fueron precisamente estas marcas las que dieron reacción negativa frente a la solución de Lugol. La marca de salchicha número 9 que desde el punto de vista cualitativo daba reacción dudosa, en el análisis cuantitativo dió un nivel de almidón de solo el 1%.

Por otra parte, las salchichas elaboradas en Alemania (marcas 13, 14 y 15) se situaron entre las que presentaban menor cantidad de almidón y de las fabricadas en España, sólo dos (marcas 8 y 9) tenían concentraciones inferiores al 1%.

Por lo que se refiere a los aspectos legales acerca de la utilización de este aditivo en los embutidos, el Código Alimentario Español (Boletín Oficial del Estado del 17 de octubre de 1967), en el capítulo X, sección 3ª, artículo 10.28. dice que "no se permitirá la adición de féculas salvo la autorización expresa para determinado tipo de

embutidos".

No obstante, la Orden del Ministerio de la Gobernación del 25 de abril de 1955 (Boletín Oficial del Estado del 10 de mayo de 1955) - complementaria del Código Alimentario en el artículo 2º señala que en los preparados y fiambres cárnicos podrá utilizarse fécula como aglutinante hasta un 10% de la pasta. Esta redacción es lo suficientemente confusa como para no permitirnos saber si los embutidos objetos de nuestros estudios, es decir mortadelas y salchichas tipo "Frankfurt", pueden incluirse entre los preparados y fiambres cárnicos a que se refiere la citada Orden Ministerial. De ser ello así solamente en una de las marcas de mortadelas analizadas, concretamente en la número 3, se superan estos niveles en el producto acabado, por lo que debería considerarse como fraude.

Una vez más la legislación española es muy poco definitiva y permite diversas interpretaciones al respecto. En resumen abogamos por el establecimiento de cantidades concretas tolerables o permitidas, entre otros, en los productos que hemos estudiado.

Hay que hacer constar que tanto en los análisis cualitativos como en los cuantitativos, la positividad y la concentración de almidón o fécula en mortadelas y salchichas tipo "Frankfurt" son tanto mayores cuanto menor es el precio a que estos productos se expenden en el mercado.

IV.3.4. Nitritos.

El estudio sobre la presencia de nitritos se realizó en 30 - marcas de diversos productos cárnicos (6 de mortadelas; 9 de salchichas tipo "Frankfurt", de las que dos eran alemanas; 9 de chorizos y 6 de jamones tipo "York"), que provenían de diversas firmas comerciales. Las muestras se obtuvieron de los productos envasados según se describe en II.3.1.2.

IV.3.4.1. Niveles de nitritos.

El análisis de nitritos en las muestras anteriormente mencionadas constó de una extracción, una purificación ("desproteínización") y una cuantificación (véase IV.2.4.).

La determinación cuantitativa se basó en una reacción de nitrosación entre el ácido sulfanílico y el nitrito, y en una copulación de la sal de diazonio resultante con la α -naftilamina para formar un colorante azoico que fue determinado colorimétricamente (Nicholas y Fox, 1973).

El contenido en nitrito residual obtenido para cada una de las marcas de los diversos productos cárnicos analizados, se recoge en las tablas XIX a XXII.

En las muestras de todas las marcas y productos analizados se detectó la presencia de nitritos, aunque a niveles muy variables que oscilaron ampliamente entre cantidades iguales o inferiores a 1 p.p.m. (marcas 9 y 6, de las tablas XX y XXI respectivamente) y 200 p.p.m. (marca número 2 de la tabla XXII).

Por otra parte, las salchichas elaboradas en Alemania (marcas 6 y 9 de la tabla XX) estuvieron entre las que menor cantidad de

TABLA XIX

Niveles de nitrito residual en muestras de diversas marcas comerciales de mortadelas (1-6) (valores expresados en $\text{mg.NaNO}_2/\text{Kg}$ de muestra).

Marca comercial.	Número de muestras (1).	Nitrito.
1	6	15,50
2	7	2,50
3	6	22,75
4	6	7,75
5	6	16,75
<u>6</u>	<u>6</u>	19,63
Total:	37	

(1) Cada muestra se analizó por triplicado.

TABLA XX

Niveles de nitrito residual en muestras de diversas marcas comerciales de salchichas tipo "Frankfurt" (1-9) (valores expresados en mg. de NaNO_2 /Kg. de muestra).

Marca comercial.	Número de muestras (1).	Nitrito.
1	6	26,75
2	6	13,75
3	6	10,25
4	6	35,50
5	6	1,88
6	6	2,50
7	7	1,63
8	6	10,00
<u>9</u>	<u>7</u>	1,00
Total: 9	56	

(1) Cada muestra se analizó por triplicado.

TABLA XXI

Niveles de nitrito residual en muestras de diversas marcas comerciales de chorizos (1-9) (valores expresados en mg.NaNO₂/Kg. de muestra)

Marca comercial.	Número de muestras (1).	Nitrito
1	6	11,75
2	6	2,13
3	6	5,25
4	6	2,50
5	6	3,13
6	7	0,88
7	6	1,25
8	6	8,75
9	6	8,38
Total:	55	

(1) Cada muestra se analizó por triplicado.

TABLA XXII

Niveles de nitrito residual en muestras de diversas marcas comerciales de jamones tipo "York" (1-6) (valores expresados en mg NaNO_2 /Kg. de muestra).

Marca comercial.	Número de muestras (1).	Nitrito
1	6	20,00
2	6	200,00
3	6	12,13
4	6	14,63
5	6	6,25
<u>6</u>	<u>6</u>	9,63
Total:	6	36

(1) Cada muestra se analizó por triplicado.

nitritos tenían y de las fabricadas en España, sólo dos (marcas 5 y 7) presentaron cantidades inferiores a 3 p.p.m.

De los diversos productos cárnicos analizados los chorizos fueron los que menor cantidad de nitritos tenían, siendo su valor medio inferior a 5 p.p.m.

Como se ha indicado más atrás (véase IV.1.4.6.) la legislación española es muy oscura en cuanto se refiere a permisibilidad de empleo de nitritos en los productos cárnicos y en los escasos ejemplos sobre los que existen normas legales, las cantidades permitidas en tales productos superan muchísimo a las que nosotros hemos encontrado y a las recomendadas por países con legislación mucho más severa.

A título de ejemplo digamos que mientras que la República Federal Alemana, Hungría y Austria no permiten emplear en los productos cárnicos que van a someterse a maduración más de 500 p.p.m. de nitrito sódico, Yugoslavia sólo autoriza 250 p.p.m., Francia y Canadá 200 p.p.m., Checoslovaquia solo 100 p.p.m. y en Noruega está totalmente prohibido su empleo. En España, como se ha indicado más atrás, se permiten 200 p.p.m. de nitrito sobre producto acabado (nitrito residual) en jamón cocido, paleta cocida, fiambre de paleta y pastel de carne de cerdo.

En otro trabajo realizado en este Departamento (Rodríguez García de la Torre, 1972), se pudo poner de manifiesto cómo los niveles de nitratos y nitritos adicionados a la masa del chorizo disminuían a medida que transcurría la maduración y a los 35 días de la misma sólo pudieron ponerse de manifiesto 5 p.p.m. Flores y col. (1978) en jamón y paleta cocidos españoles, encontraron niveles residuales de nitratos y nitritos de 219 y 33 p.p.m., valores también inferiores a los máximos establecidos por la legislación española.

En consecuencia, de acuerdo con los resultados encontrados en este Departamento y los hallados por Flores y col., las cantidades reco
mendadas por la legislación española debieran referirse a cantidades in
corporadas al producto que va a ser tratado tecnológicamente y no a pro
ducto terminado. De otra parte el nivel residual de nitrito, debería
reducirse a una cantidad máxima de 10 a 50 p.p.m., dependiendo del tipo
de producto. Este es el criterio que predomina en el Comité del Codex
sobre Productos Cárnicos (Anon. 1975).

Aunque hace unos años los fabricantes de embutidos tendían al
empleo de cantidades realmente altas de nitratos cuya reducción a nitrí
tos exigía bastante tiempo, en la actualidad el empleo de sales nitrifi
cantes en las que predominan los nitritos ha acortado mucho el tiempo
necesario para su reducción. En el estudio de Rodríguez García de la
Torre, antes citado, se observó que el paso de nitrito a óxido nítrico
se verificaba en gran parte en la fase madurativa previa al llenado de
las tripas.

La preocupación por los nitritos residuales, como se indicó
en IV.1.4.5., es consecuencia del problema que supone la formación de
nitrosaminas. A este respecto se ha señalado en E.E.U.U. que con tal de
que el nitrito residual no supere las 10 p.p.m. no existe peligro de
producción de nitrosaminas.

Deibel y col. (1961) atribuyen la presencia de vestigios de
nitratos y nitritos en los embutidos que ellos analizaron a que su re-
ducción tiene lugar entre las 2 y 16 horas de adicionados al embutido.

Del mismo parecer son Cantoni y col. (1972), quienes también
han demostrado la rápida disminución de los nitritos adicionados a los
productos cárnicos en salazón. Finalmente, como señala Klettner (1979)

en Yugoslavia se ha comprobado que la adición de 250 p.p.m. de nitritos a embutidos sometidos a maduración permite su detección después de 14 días madurando. Sin embargo, transcurridas 4 semanas la cantidad de nitritos descendió a niveles menores de 10 mg/Kg., cualquiera que hubiera sido la cantidad inicial adicionada a la masa.

Jolley (1979) también ha comprobado el rápido descenso del nivel de nitritos en bacon, tipo "Wiltshire", al que se adicionó nitratos, cuando este producto provenía de cerdos que tenían en su musculatura un pH último normal.

Llama poderosamente la atención la cantidad de nitrito residual encontrado en una marca de jamón tipo "York" española (la número 2 de la tabla XXII), cuyo contenido de nitrito residual está relativamente próximo a niveles considerados como tóxicos para el organismo humano (250 p.p.m.) (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Inglaterra, 1959).

El muestreo realizado ha sido bastante amplio considerando - que se han analizado productos cárnicos procedentes de firmas comerciales situadas en 14 provincias repartidas por toda la geografía española, por lo que creemos que nuestros resultados reflejan bien la situación española en lo que concierne al empleo de nitritos en los productos cárnicos del tipo de los estudiados.

CAPITULO V.

CONCLUSIONES.

CAPITULO V.

CONCLUSIONES.

1.- Todos los animales objetos de nuestro estudio que recibieron - con el pienso sustancias antitiroideas presentaron tiroides cuyo peso superó siempre al descrito para estos animales en los tratados de anatomía, llegando en algunos casos a ser 15 veces mayor.

2.- A pesar de que el empleo de estas sustancias está prohibido en España desde el 30 de junio de 1977, en todos los animales estudiados se pudo comprobar su empleo.

3.- La carne de los animales que reciben tireostáticos presenta una tonalidad más pálida que la característica de la carne de ganado vacuno, así como una cantidad de líquido intersticial muy superior a la de aquéllos; el hígado presenta una coloración normal y macroscópicamente no se diferencia de los animales que no reciben antitiroideos.

4.- En los tejidos analizados, obtenidos de un matadero industrial, se han detectado los siguientes antitiroideos: metil-tiouracilo, propil-tiouracilo, fenil-tiouracilo y tapazol, lo que parece indicar que en la práctica corriente de explotación animal se prefieren los derivados del tiouracilo al producto madre.

5.- El derivado de tiouracilo más frecuentemente detectado es el propil-tiouracilo que aparece en el 70% de los extractos de tiroides - examinados, y en el 30% de los procedentes de musculatura cervical y de hígado.

6.- El método colorimétrico de Van Waes permite la cuantificación de las sustancias antitiroideas en los tejidos animales; en el hígado

da recuperaciones finales del orden del 80 al 85%. Los niveles de derivados del tiouracilo detectados en tiroides oscilan entre 0,43 y 12,90 µg/g. de tejido; en el hígado entre 0,33 y 3,95 µg/g. de tejido y en el músculo entre 0,23 y 2,15 µg/g. de tejido.

7.- La cromatografía en capa fina con sílica gel G-60, de los extractos obtenidos en acetonitrilo/agua (9/1) (v/v) y purificados con n-hexano, empleando como solventes éter de petróleo/éter etílico(40/60) (v/v) y como revelador reactivo de vainillina, permite identificar los siguientes estrógenos de síntesis: dietilestilbestrol cis, dietilestilbestrol trans, dienestrol y hexestrol.

8.- Ni en los extractos de hígado, ni en los de musculatura cervical inferior, de los animales objetos de esta tesis se pudo detectar ningún estrógeno de síntesis, bien porque no los contenían o bien porque su concentración, en caso de contenerlos, era menor de 1 µg/g. de muestra.

9.- En extractos de embutidos, cromatografiados en capa fina de sílica gel G-60, desarrollados con n-propanol/n-butanol/agua (30/30/30) (v/v/v) y revelados con metaperyodato sódico y reactivo de bencidina - se diferencia claramente la glucono-δ-lactona de otros posibles carbohidratos que se encuentren en la muestra, dado que su R_f (0,27) y su color amarillo característico la diferencian netamente.

10.- En el 75% de los salamis analizados, en el 83% de los chorizos y en el 100% de los salchichones analizados se ha puesto de manifiesto la presencia de este aditivo, lo que indica que se trata de una sustancia ampliamente utilizada por la industria española elaboradora de embutidos.

11.- El aspecto al corte de los chorizos elaborados con glucono- δ -lactona no se diferencia en absoluto del de los que se fabricaron sin añadirles este aditivo; sin embargo, se observa una retracción de la tripa que se hace cada vez mayor en los embutidos que llevan glucono- δ -lactona, cosa que no ocurre con los que se fabricaron sin este aditivo.

12.- A partir de los dos meses de fabricado el chorizo la calidad organoléptica del elaborado con glucono- δ -lactona es menor que la de los que carecen de este aditivo. La glucono- δ -lactona no contribuye a la estabilidad del color de los embutidos.

13.- La detección de proteínas de soja se ha realizado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5%, siguiendo la técnica de Homayounfar previo tratamiento térmico de la muestra y modificada en el sentido de utilizar tratamientos de 120°C. durante una hora.

14.- El porcentaje mínimo de proteína "aislada" de soja que se puede detectar por la técnica citada en mezclas de carne y soja es un 5%; la intensidad del color de las bandas electroforéticas de la soja aumenta a medida que lo hacen las concentraciones de esta sustancia en la mezcla.

15.- De 15 marcas diferentes de salchichas tipo "Frankfurt" analizadas en 11 se detectó proteína de soja, mientras que de las 9 marcas de mortadelas estudiadas sólo una carecía de esta proteína.

16.- En el 100% de las muestras de mortadelas estudiadas y en el 73% de las salchichas tipo "Frankfurt" pudo ponerse de manifiesto mediante la solución yodo-yodurada, la presencia de almidón.

17.- La sensibilidad de los métodos de Dubois y col. y de Glover y col., de acuerdo con nuestros resultados, es la misma; sin embargo, el primero aventaja al de Glover y col. en su rapidez y en la mayor estabilidad de la reacción colorimétrica.

18.- Las concentraciones de almidón detectadas en las mortadelas oscilan entre el 4 y el 13% aproximadamente y las de las salchichas tipo "Frankfurt" entre el 0,20 y el 8%. Se ha observado que son aquellos embutidos más baratos los que presentan mayor porcentaje de almidón.

19.- En todas las muestras de mortadelas, salchichas tipo "Frankfurt", chorizos y jamones tipo "York" se puso de manifiesto la presencia de nitrito residual, a concentraciones muy variables que oscilaron entre cantidades iguales o inferiores a 1 p.p.m. y (en un sólo caso) 200 p.p.m.

20.- De todos los productos cárnicos que hemos analizado los chorizos fueron los que presentaron menor cantidad de nitritos (como media menos de 5 p.p.m.) lo que contrasta con las cifras máximas de este aditivo autorizadas por la legislación española que creemos son excesivas.

BIBLIOGRAFIA.

BIBLIOGRAFIA.

- ABRAHAM, G.E., (1969): J. Clin. Endocrinol. Metab., 29, 866.
- ABRAHAM, G.E., (1973): En "Modern Methods in Steroid Analysis" (E. Heftman, ed.), Academic Press, New York, p. 451.
- ABRAHAM, G.E., REIFMAN, E.M., BUSTER, J.E., DISTEPHANO, J. y MARSHALL, J.R., (1972): Analyt. Letts., 5, 479.
- ACTON, J.C. y DICK, R.L., (1977): J. Food Prot., 40, 398.
- ADRIAANSE, A. y ROBBERS, J.E., (1969): J. Sci. Food Agric., 20, 321.
- ALLEN, E. y DOISY, E.A., (1923): J. Am. Med. Ass., 81, 819.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, (1975): Am. Soc. Microbiol. News, 41, 225.
- ANDREWS, F.N. y BEESON, W.M., (1953): J. Animal Sci., 12, 182.
- ANDREWS, F.N., BEESON, W.M. y HARPER, C., (1949): J. Animal Sci., 8, 758.
- ANON., (1970): Meat, 36, 24.
- ANON., (1975): Informe del Comité del Codex sobre Productos Cárnicos Elaborados, Alinorm 76/16, FAO/OMS, Roma.
- A.O.A.C., (1975): "Official Methods of Analysis", 12th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., p. 782.
- AOKI, H., (1965): J. Agr. Chem. Soc. Japan, 39, 270.
- AOKI, H. y SAKURAI, M., (1968): J. Agr. Chem. Soc. Japan, 42, 544.
- ASCHBACHER, P.W., (1972): J. Animal Sci., 35, 1031.
- ASCHBACHER, P.W., (1976): J. Toxicol. Environ. Hlth., Suppl. 1, 45.
- ASCHBACHER, P.W. y THACKER, E.J., (1974): J. Animal Sci., 39, 1185.
- ASTWOOD, E.B., (1938): Endocrinology, 23, 25.
- ASTWOOD, E.B., (1943): J. Pharmacol. Exper. Therap., 78, 79.
- ASWORTH, J. y SPENCER, R., (1972): J. Food Technol., 7, 111.
- AYANUBA, A. y ALEXANDER, M., (1973): Appl. Microbiol., 25, 862.

- BADENHUIZEN, N.P., (1959): "Chemistry and Biology of the Starch Granule", Springer Verlag, Vienna.
- BAILEY, M.E. y SWAIN, J.W., (1973): Proc. Meat Industry Res. Conf., Chicago, p. 29.
- BANKS, W., GREENWOOD, C.T. y MUIR, D.D., (1973): En "Molecular Structure and Function of Food Carbohydrate", (G.G. Birch y L.F. Green, eds.), Wiley, New York.
- BARD, J. y TOWNSEND, W.E., (1971): En "The Science of Meat and Meat Products", (J.F. Price y B.S. Schweigert, eds.), Freeman, San Francisco, p. 453.
- BARNES, J.M. y MAGEE, P.N., (1954): Br. J. Ind. Med., 11, 167.
- BARNETT, H.W., NORDIN, H.R., BIRD, H.O. y RUBIN, L.J., (1965): Proc. 11th Eur. Meet. Meat Res. Workers, Belgrade.
- BELLANI, L., (1970): Vet. Ital., 21, 579.
- BENNETTS, H.W., (1946): Austr. Vet. J., 22, 70.
- BERGMEYER, H.U., (1963): "Methoden der Enzymatischen Analyse", Verlag Chemie, Weinheim, p. 139.
- BERNARDIN, J.E. y KASARDA, D.D., (1973): Cereal Chem., 50, 529.
- BODANSKY, O., (1951): Pharmacol. Rev., 3, 145.
- BÖHNEL, H.T., (1966): "Untersuchungen zum Rückstandsproblem nach Anwendung von MTU in der Jungbullenmast", Vet. Med. Diss., München.
- BOLTON, W., (1960): Analyst, 85, 189.
- BOLTZ, D.F., (1973): ORC Crit. Rev. Analyt. Chem., 4, 166.
- BOSCO, G., (1971): Nuovi Ann. Ig. Microbiol., 22, 115.
- BOYLAND, E., NICE, E. y WILLIAMS, K., (1971): Food Cosmet. Toxicol., 9, 639.
- BRABANDER, H.F. y VERBEKE, R., (1975): J. Chromatogr., 108, 141.

- BRATTON, A.C. y MARSHALL, E.K., (1939): J. Biol. Chem., 128, 537.
- BRAUN, B. y HIEKE, C., (1966): Z. Lebensm. Untersuch. Forsch., 130, 273.
- BROCKAW, G.Y., (1962): Can. Food Ind., 33, 36.
- BROOKS, J., HAINES, R.B., MORAN, T. y PACE, J., (1940): Food Inv. Spec. Report, 49, H.M.S.O., London.
- BRUGGEMANN, J. y SCHOLE, J., (1967): Landwirtsch. Forsch. Sonderh., 21, 134.
- BURNETT, R.S., (1951): En "Soybeans and Soybean Products", vol. II, - (K. Markley, ed.), Interscience Publ., Inc., New York.
- BURROUGHS, W.C., CULBERSTON, C., KASTELIC, J., CHENG, E. y HALE, W.H., (1954): Science, 120, 66.
- BURROWS, H. y HORNING, E.S., (1952): "Oestrogens and Neoplasia", Blackwell Publ., Oxford.
- CANTONI, C., BENATTI, R., L'ACQUA, V. y BERETTA, C., (1972): Arch. Vet. It., 23, 33.
- CANTONI, C. y DRAGONI, I., (1975): Ind. Alimentari, 14, 117.
- CANUTI, A., BOLZONI, G., COPPIARDI, G. y GARATTI, A., (1972): Ind. Alimentari, 11, 88.
- CASARES, J., (1954): "Tratado de Análisis Químico", tomo III, Ed. por R. Casares, Madrid, p. 431.
- CATSIMPOOLAS, N. y MEYER, E.W., (1970): Cereal Chem., 47, 559.
- CHO, I.C. y BRATZLER, L.J., (1970): J. Food Sci., 35, 668.
- CHRISTIANSEN, L.N., TOMPKIN, R.B., SHAPARIS, A.B., KUEPER, T.V., JOHNSTONS, R.W., KAUTER, D.A. y KOLARI, D., (1974): Appl. Microbiol., 27, 733.
- CHRISTNER, J.E. y FETTER, M.C., (1974): Steroids, 24, 327.
- CIRCLE, S.J. y JOHNSON, D.W., (1958): En "Processed Plant Protein Food

- stuffs", (A.M. Altschul, ed.), Academic Press, New York.
- CIRCLE, S.J., MEYER, E.W. y WHITNEY, R.W., (1964): Cereal Chem., 41, 157.
- CLEMENTS, F.W., (1957): Med. J. Austral., 47, 645.
- COLEMAN, R.J. y CRESWICK, N.S., (1966): U.S. Patent 3,253,931, May 31, (A favor de T.J. Lipton, Inc.).
- COLLINS-THOMPSON, D.L., CHANG, P.C., DAVIDSON, C.M., LARMOND, E. y PIVNICK, H., (1974): J. Food Sci., 39, 607.
- COOMARASWAMY, M. y FLINT, F.O., (1973): Analyst, 98, 542.
- CORETTI, K., (1971): Fleischerei, 22, 31.
- COUEDOR, A., DURAND, P. y ROZIER, J., (1970): Rec. Méd. Vét., 146, 791.
- COWIE, A.T. y FOLLEY, S.J., (1961): "Sex and internal secretions", Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, p. 590.
- CROSBY, N.T. y SAWYER, R., (1976): Adv. Food Res., 22, 1.
- D'APPOLONIA, B.L., GILLES, K.A., OSMAN, E.M. y POMERANZ, Y., (1971): En "Wheat Chemistry and Technology", (Y. Pomeranz, ed.), 2nd ed., American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, p. 301.
- DEIBEL, R.H., NIVEN, C.F. y WILSON, G.D., (1961): Appl. Microbiol., 9, 156.
- DE ROBERTIS, E. y GRASSO, R., (1946): Endocrinology, 38, 137.
- DE ROBERTIS, E. y NOWINSKI, W.W., (1946): J. Clin. Endocrinol., 6, 235.
- DODOS, E.C., GOLDBERG, L., LAWSON, W. y ROBINSON, R., (1938): Nature, 141, 247.
- DONOHU, A.L., JOHNSON, W.S., SIECK, R.F. y SULLIVAN, W.L., (1973): J. Ass. Off. Anal. Chem., 56, 785.
- DRUCKERY, H., PREUSSMANN, R., IVANKOVIC, S. y SCHMÄHL, D., (1967): Z. Krebsforsch., 69, 103.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. y SMITH, F., - (1956): Anal. Chem., 28, 350.

- DUBOIS, M.P., (1965): Compt. Rend. Soc. Biol., 159, 1955.
- DUDA, Z., MIELNIK, J., NOWAK, A. y PEZACKI, W., (1976): Proc. 22nd Eur. Meet. Meat Res. Workers, Malmö, F5:1.
- DUNCAN, C.L. y FOSTER, E.M., (1968): Appl. Microbiol., 16, 401.
- ELDRIDGE, A.C., HALL, P.K. y WOLF, W.J., (1963): Food Technol., 17, 1952.
- EMMENS, C.W. y COX, R.J., (1960): J. Endocrinol., 20, 605.
- ENDER, F. y CEH, L., (1968): Food Cosmet. Toxicol., 6, 569.
- ENDER, F. y CEH, L., (1971): Z. Lebensm. Untersuch. Forsch., 145, 133.
- EXLEY, D., JOHNSON, M.W. y DEAN, P.D.G., (1971): Steroids, 18, 605.
- FACCINI, G., MARCATO, P. y VENTURINI, A., (1969): Ind. Alimentari, 8, 50.
- FAO/WHO, Simposio Roma, (1975): "Anabolic Agents in Animal Production", (F.C. Lu y J. Rendel, eds.), Georg Thieme Publ., Stuttgart, 1976.
- FAZIO, T., WHITE, R.H. y HOWARD, J.W., (1971): J. Ass. Off. Anal. Chem., 54, 1157.
- FERRANDO, R., (1972): "Journée d'étude consacrée à l'utilisation des oestrogènes en élevage", Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 19 mai 1972, p. 49.
- FERRANDO, R. y RENARD, A., (1968): Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 1855.
- FERRANDO, R., VALETTE, J., LE BARS, H. y BRUGERE, H., (1975): C.R. Acad. Sci., Sér. D, 278, 1091.
- FIELDS, E.M., (1957): J. Am. Med. Ass., 163, 817.
- FISCHER, K.H. y BELITZ, H.D., (1971): Z. Lebensm. Untersuch. Forsch., 145, 271.
- FLORES, J., MIRO, E. y NIETO, P., (1978): Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment., 18, 313.
- FOLLET, M.J. y RATCLIFF, P.W., (1963): J. Sci. Food Agric., 14, 138.
- FOX, J.B., Jr., (1966): J. Agric. Food Chem., 14, 207.

- FOX, J.B., Jr., TOWNSEND, W.E., ACKERMAN, S.A. y SWIFT, C.E., (1967) :
Food Technol., 21, 386.
- FRANK, S.S. y CIRCLE, S.J., (1959): Food Technol., 13, 307.
- FRASER, J.R., BRENDON-BRAVO, M. y HOLMES, D.C., (1956): J. Sci. Food Agric., 7, 577.
- FREIMUTH, U. y KRAUSE, W., (1970): Ernährungsforschung, 15, 367.
- FUJIMAKI, M., EMI, M. y OKITAMI, A., (1975): Agr. Biol. Chem., 39, 371.
- GASS, G.H., COATS, D. y GRAHAM, N., (1964): J.Natl. Cancer Inst., 33, 977.
- GAWEHN, K., (1967): Mitt. GDCh-Fachgr. Lebensmittelchem. Gerichtl.Chem., 21, 238.
- GERHARDT, V. y HALLER, S., (1973): Fleischwirtschaft, 53, 548.
- GISSEL, C. y SCHAAL, M., (1974): Arch. Lebensmittelhyg., 25, 8.
- GLOVER, W., KIRSCHENBAUM, H. y CALDWELL, A., (1966): J. Ass. Off. Anal. Chem., 49, 307.
- GRAY, V.M. y SCHOCH, T.J., (1962): Stärke, 14, 239.
- GREENWOOD, G.T., (1956): Adv. Carbohydr. Chem., 11, 335.
- GRIEM, W., (1975): Fleischwirtschaft, 55, 1719.
- GRIESS, P., (1879): Ber. Deut. Chem. Ges., 12, 426.
- GROLLMAN, A. y GROLLMAN, E.F., (1970): "Pharmacology and Therapeutics",
7th ed., Lea & Febiger, Philadelphia.
- GRUNERT, E., HARMS, F., POZVARI, M. y DIEDERICHSEN, J., (1974): Arch. Lebensmittelhyg., 25, 188.
- GÜNTHER, H., (1967): Deutsch. Lebensm. Rundsch., 63, 8.
- GUY, R.C.E., JARAYAM, R.J. y WILCOX, C.J., (1973): J. Sci. Food Agric., 24, 1551.
- HACKLER, L.R., VAN BUREN, J.P., STEINKRAUS, K.H., EL RAWI, I. y HAND
D.B., (1961): J. Food Sci., 25, 723.

- HALDANE, J., (1901): J. Hyg., 1, 115.
- HAMM, R. y SCHNEIDER, F., (1968): Deutsch. Lebensm. Rundsch., 64, 207.
- HANSEN, M.A., (1964): Nord. Vet. Med., 16, 323.
- HANSON, H.L., CAMPBELL, A. y LINEWEAVER, H., (1951): Food Technol., 5, 432.
- HANSON, H.L., NISHITA, K.D. y LINEWEAVER, H., (1953): Food Technol., 7, 462.
- HARDY, R. y MACKIE, P., (1969): J. Sci. Food Agric., 20, 193.
- HARRISON, V.C. y PEAT, G., (1975): Am. J. Clin. Nutr., 28, 1351.
- HATCHER, D.W. y SCHALL, E.D., (1965): J. Ass. Off. Anal. Chem., 48, 648.
- HAWKSWORTH, G.M. y HILL, M.H., (1971): Biochem. J., 122, 28.
- HEDLER, L. y MARQUART, P., (1968): Food Cosmet. Toxicol., 6, 341.
- HEFFTER, VON A., VOOKS, R. y WALTHER, G., (1972): Deutsch. Lebensm.-Rundsch., 68, 367.
- HERBST, A.L., (1976): J. Toxicol. Environ. Hlth., Suppl. 1, 13.
- HERBST, A.L., ULFELDER, H. y POSKANZER, D.C., (1971): New Engl. J. Med., 284, 878.
- HERRING, H.K., (1973): Proc. Meat Ind. Res. Conf., Am. Meat Inst. Found., Arlington, Virginia, p. 47.
- HINDS, F.C., DRAPER, H.H., MITCHELL, G.E.Jr. y NEUMANN, A.L., (1965): J. Agr. Food Chem., 13, 256.
- HOFFMANN, B., (1972): J. Endocrinol., 52, 40.
- HOFFMANN, B. y KARG, H., (1973): Acta Endocrinol., Suppl. 177, 44.
- HOFFMANN, K., (1977): Ann. Nutr. Alim., 31, 207.
- HOFFMANN, K. y PENNY, I.F., (1971): Fleischwirtschaft, 51, 577.
- HOMAYOUNFAR, H., (1975): Cahs. Nutr. Diet., 4, 37.
- HORNSEY, H.C., (1959): Food Manuf., 34, 467.

- HOWLING, D., (1974): Food Technol. Aust., 26, 464.
- HUBER, T.L., HORN, G.W. y BEADLE, R.E., (1972): J. Animal Sci., 34, 786.
- HUSEBY, R.A., (1958): En "Breast Cancer", (A. Segaloff, ed.), Mosby, St. Louis, Mo., p. 65.
- HUSTAD, G.O., CERVENY, J.G., TRENK, H., DEIBEL, R.H., KAUTTER, D.A., FAZIO, T., JOHNSTON, R.W. y KOLARI, O., (1973): Appl. Microbiol., 26, 22.
- HWANG, G.S., (1973): M.S. Thesis, University of Illinois, Urbana, Ill.
- ILOSVAY, M.L., (1889): Bull. Soc. Chim. Fr., 2, 388.
- INGBAR, S.H. y WOEBER, K.A., (1968): En "Textbook of Endocrinology", - 4th ed., (R.H. Williams, ed.), W.B. Saunders Co., Philadelphia, p. 105.
- INGRAM, M., (1974): Proc. Int. Symp. Nitrite Meat Prods., Zeist. Pudoc, Wageningen, Holanda, p. 63.
- IRWIN, G.W., VAN VACTOR, H.D. y NORRIS, M.S., (1952): J. Am. Med. Ass., 149, 1637.
- JARC, H., RUTNER, O. y KROCZA, W., (1977): J. Chromatogr., 134, 351.
- JIANG, N.S. y RYAN, R.J., (1969): Mayo Clin. Proc., 44, 461.
- JOHNSON, D.W., (1970): J. Am. Oil. Chem. Soc., 47, 402.
- JOHNSTON, M.A., PIVNICK, H. y SAMSON, J.M., (1969): Can. Inst. Food Technol. J., 2, 52.
- JOLLEY, P.D., (1979): J. Food Technol., 14, 81.
- KALOYEREAS, S.A., (1950): Scientif. Month., 71, 422.
- KAMM, L., McKEOWN, G.G. y MORRISON SMITH, D., (1965): J. Ass. Off. Anal. Chem., 48, 892.
- KAWAMURA, S., (1967): Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ., 18, 117.
- KEELE, G.A. y NEIL, E., (1965): "Samson Wright's Applied Physiology", 11th ed., Oxford University Press, London.
- KELLEY, J.J. y PRESSEY, R., (1966): Cereal Chem., 43, 195.

- KENNEDY, T.H., (1942): Nature, 150, 233.
- KERR, R.H., MARSH, C.T.N., SCHROEDER, V.F. y BOYER, A.E., (1926): J.-Agric. Res., 33, 541.
- KEYBETS, M.J., BROOT, E.H. y KELLER, G.H., (1970): Food Cosmet. Toxicol., 8, 167.
- KIES, M.W., HAINING, J.L., PISTORIUS, E., SCHROEDER, D.H. y AXELROD, B., (1969): Biochem. Biophys. Res. Comm., 36, 312.
- KILLION, P.J. y FOSTER, J.F., (1960): J. Polym. Sci., 46, 65.
- KLEIN, D., POULLAIN, B. y DEBRY, G., (1976): Ann. Nutr. Alim., 30, 1.
- KLETTNER, P.G., (1979): Fleischwirtschaft, 59, 221.
- KNOTES, Z. y SCHMIDT, P., (1964): Pediatrics, 34, 78.
- KOHRMAN, K.A. y McGEE, J., (1977): J. Ass. Off. Anal. Chem., 60, 5.
- KOLB, E., (1971): "Fisiología Veterinaria", Ed. Acribia, Zaragoza, p. 78.
- KOPPANG, N., (1964): Nord. Vet. Med., 16, 305.
- KORENMAN, S.G., STEVENS, R.H., CARPENTER, L.A., ROB, M., NISWENDER, G.D. y SHERMAN, B.M., (1974): J. Clin. Endocrinol. Metab., 38, 718.
- KOSHIYAMA, I., (1968): Agr. Biol. Chem. (Tokyo), 32, 879.
- KOSHIYAMA, I., (1970): Agr. Biol. Chem. (Tokyo), 34, 1815.
- KOTTER, L., PALITZSCH, A. y GEIGER, G., (1968): Fleischwirtschaft, 48, 1333.
- KOTTER, L., PALITZSCH, A. y KUNDRAT, W., (1969): Fleischwirtschaft, 49, 321.
- KREULA, M. y KIESVAARA, M., (1959): Acta Chem. Scand., 13, 1375.
- KROES, R., RUITENBERG, E.J. y BERKVEN, J.M., (1970): Zblatt. Vet. Med. A., 17, 440.
- KROL, B., (1976): Wien. Tierärztl. Mschr., 63, 161.
- KRUGER, H. y GROSSKLAUSS, D., (1971): Fleischwirtschaft, 51, 315.

- KRYLOVA, V.V., BELOVA, V. Yu. y MERKULOVA, V.K., (1970): Trudy, Vsesoyuznyi Nauchno-Issledovatel'skiy Institut Myasnoi Pronyshlennosti, 23, 11, (Resumen de F.S.T.A.: 38321, (4), 1972).
- LABIE, C., (1970): Rev. Méd. Vét., 121, 425.
- LAITEM, L. y GASPAR, P., (1977): J. Chromatogr., 140, 266.
- LEE, E.Y.C., MERCIER, C. y WHELAN, W.J., (1968): Arch. Biochem. Biophys. 125, 1028.
- LEE, Y.B., RICKANSRUUD, D.A., HAGBERG, E.C. y BRISKEY, E.J., (1975): J. Food Sci., 40, 380.
- LEWIS, W.L. y VOSE, R.S., (1926): Inst. Am. Meat Packs. Bull., 1926.
- LIEBERMAN, S., ERLANGER, S.A., BEISER, S.M. y AGATE, F., (1959): Recent. Progr. Horm. Res., 15, 165.
- LIENER, I.E. y KAKADE, M.L., (1969): En "Toxic Constituents of Plant Foodstuffs", (I.E. Liener, ed.), Academic Press, New York.
- LIJINSKY, W. y EPSTEIN, S.S., (1970): Nature, 225, 21.
- LORENZ, F.W., (1943): Poultry Sci., 22, 190.
- LORENZ, F.W., (1954): Vit. Horm., 12, 235.
- LU, F.C. y RENDEL, J., (1976): "Anabolic Agents in Animal Production", Georg Thieme Publ., Stuttgart.
- LUCISANO, A. y SPLENDIANI, F., (1971): Zooprofilassi, 26, 293.
- MAGEE, P.N. y BARNES, J.M., (1956): Br. J. Cancer, 10, 114.
- MAGEE, P.N. y BARNES, J.M., (1967): Adv. Cancer Res., 10, 163.
- MARCATO, A., (1969): Ann. Accad. Naz. Agricolt., 89, 61.
- MARKLEY, K.S., (1950): "Soybeans and Soybean Products", vol. I, Interscience Publ., Inc., New York.
- MARTIN, L., (1960): J. Endocrinol., 20, 187.
- MARX, J.L., (1976): Science, 191, 838.

- McANALLY, J.K., (1964): U.S. Patent 3,142,571, July 28, (A favor de Swiftand Co.).
- McGAVACK, T.H., (1953): Mayo Clin. Proc., 37, 695.
- MEANS, T.M., ANDREWS, F.N. y BEESON, W.M., (1953): J. Animal Sci., 12, 176.
- MERCK, (1968): "The Merck Index", 8^a ed., (P.G. Stecher, ed.), Merck & Co., Rahway, New Jersey, p. 494.
- METZ, H., (1961): Naturwissenschaften, 48, 569.
- METZLER, M., (1976): J. Toxicol. Environ. Hlth., Suppl. 1, 21.
- MEYER, E.W., (1967): Proc. Int. Conf. on Soybean Protein Foods., U.S. Dept. Agr., ARS-71-35, p. 142.
- MICKELSEN, O. y YANG, M.G., (1966): Fed. Proc., 25, 104.
- MIRVISH, S.S., WALLCAVE, L., EAGEN, M. y SHUBIK, P., (1972): Science, 177, 65.
- MITCHELL, G.E. Jr., NEUMANN, A.L. y DRAPER, H.H., (1959): J. Agr. Food Chem., 7, 509.
- MÜHLER, K., (1974): Proc. Int. Symp. Nitrite Meat Prods., Zeist, Pudoc, Wageningen, Holanda, p. 13.
- MONAGLE, C.W., TOLEDO, R.T. y SAFFLE, R.L., (1974): J. Food Sci., 39, 602.
- MORTON, M.E., PERLMAN, I., ANDERSON, E. y CHAIKOFF, I.L., (1942): Endocrinology, 30, 495.
- MOSHY, R.J., (1964): U.S. Patent. 3,126,286, March 24, (A favor de General Food Corp.).
- MOTTRAM, D.S. y RHODES, D.N., (1974): Proc. Int. Symp. Nitrite Meat - Prods., Zeist, Pudoc, Wageningen, Holanda, p. 161.
- MÜHLBOCK, O., (1960): En "Biological Activities of Steroids in Relation to Cancer", (G. Pincus y E.P. Volmer, eds.), Academic Press, New York, p. 331.

- MÜHLBOCK, O. y BOOT, L.M., (1958): En "Ciba Foundation Symposium on Carcinogenesis; Mechanism of Action", (G.E.W. Wolstenholme y M. O'Connor, eds.), Little Brown, Boston, 1959, p. 83.
- MUSTAKAS, G.C., KIRK, L.D. y GRIFFIN, E.L.Jr., (1962): J. Am. Oil Chem. Soc., 39, 222.
- NALBANDOV, A.V., (1969): En "The Use of Drugs in Animal Feeds", Natl. Acad. Sci. Publ. Nº 1679, Washington, D.C., p. 165.
- NICHOLAS, R.A. y FOX, J.B. Jr., (1973): J. Ass. Off. Anal. Chem., 56, 922.
- NIEMOLLER, H.J., (1966): Deutsch. Lebensm. Rundsch., 62, 76.
- NIINIVAARA, F.P., (1955): Acta Agraria Fennica, 91, 17.
- NORRIS, F., (1964): En "Bailey's Industrial Fats and Oils", (D. Swern, ed.), Interscience Publ., Inc., New York.
- OKEY, A.B. y GASS, G.H., (1968): J. Natl. Cancer Inst., 40, 225.
- OLSMAN, W.J., HOUTEPEN, W.H.C. y LEEUWEN, C. VAN, (1969): Z. Lebensm. Untersuch. Forsch., 141, 253.
- ORDOÑEZ, J.A., (1974): Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Oviedo, León.
- OSBORNE, T.B. y MENDEL, L.B., (1917): J. Biol. Chem., 32, 369.
- OSMAN, E.M., (1967): En "Starch: Chemistry and Technology", vol. 2, - (R.L. Whistler y E.F. Paschall, eds.), Academic Press, New York, p. 153.
- OSMAN, E.M., (1972): En "Food Theory and Applications", (P.C. Paul y H.H. Palmer, eds.), Wiley, New York, p. 151.
- OSMAN, E.M. y DIX, M.R., (1960): Cereal Chem., 37, 464.
- PARKES, A.S., (1945): Physiol. Rev., 25, 203.
- PARSONS, A.L. y LAWRIE, R.A., (1972): J. Food Technol., 7, 455.
- PATE, T.D., SHULER, R.O. y MANDIGO, R.W., (1971): J. Food Sci., 36, 48.
- PEARSON, A.M., SPOONER, M.E., HEGARTY, G.R. y BRATZLER, L.J., (1965):

- Food Technol., 19, 1841.
- PERRY, T.W., ANDREWS, F.N. y BEESON, W.M., (1951): J. Animal Sci., 10, 602.
- PFEIL, E. y LIEPE, H.U., (1974): Fleischwirtschaft, 54, 177.
- PHILLIPS, W.E.J., (1968): Can. Inst. Food Technol. J., 1, 98.
- PHILLIPS, W.E.J., (1971): Food Cosmet. Toxicol., 9, 219.
- POHJA, M.S., (1960): Acta Agraria Fennica, 96, 7.
- POLENSKI, E., (1891): Citado por Wasserman y Talley 1972.
- POMERANZ, Y., (1961): J. Food Sci., 26, 307.
- PRESTON, R.L., (1975): J. Animal Sci., 41, 1414.
- PRESTON, R.L., KLOSTERMAN, E.W. y CAHILL, V.R., (1971): J. Animal Sci., 33, 491.
- PRICE, J.F. y SCHWEIGERT, B.S., (1976): "Ciencia de la Carne y de los Productos Cárnicos", Ed. Acribia, Zaragoza, p. 500.
- PUCHER, C.W., LEAVENWORTH, C.S. y VICKERY, H.B., (1948): Anal. Chem., 20, 850.
- QUEVAUVILLIER, A. y BINET, P., (1962): Thérapie, 17, 775.
- RADOMSKI, J.L., BRILL, E., DEICHMANN, W.B. y GLASS, E.M., (1971): Cancer Res., 31, 1461.
- RAI, V.R. y CONSTANTINIDES, A., (1973): AIChE Symposium Series 69, - (132), 114.
- RAKOSKY, J.Jr., (1970): J. Agr. Food Chem., 18, 1005.
- RAUN, A.P., COOLEY, C.P. y SMITH, F.A., (1970): J. Animal Sci., 31, 252.
- ROBERTS, T.A. e INGRAM, M., (1966): J. Food Technol., 1, 147.
- ROCK, H., SIPOS, E.F. y MEYER, E.W., (1966): Meat, 32, 52.
- RODRIGUEZ GARCIA DE LA TORRE, P., (1972): Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid.
- RODRIGUEZ MARIN, J.L., (1979): Comunicación personal.

- ROMBAUTS, P.A., (1973): C.R. Acad. Sci. Paris, 277, 1921.
- RUITENBERG, E.J., BERKENS, J.M., HUIS IN 'T VELD, L.G., HUISMANS, J.W. y VAN LOGTEN, M.J., (1972): Fleischwirtschaft, 52, 64.
- RUITENBERG, E.J., KROES, R. y BERKENS, J.M., (1967): Tijdschr. Diergeneesk., 92, 819.
- RUMSEY, T.S., OLTJEN, R.R., DANIELS, F.L. y KOZAK, A.S., (1975): J. Animal Sci., 40, 539.
- RUSOFF, I.I., DHAN, W.J. y LONG, C.L., (1962): U.S. Patent. 3,047,395. July 31, (A favor de General Food Corp.).
- RYAN, J.J., (1976): J. Chromatogr., 127, 53.
- SAIR, L. y HENRY, W.E., (1967): Proc. 10th Ann. Conf. Can. Inst. Food Technols., Montreal.
- SANDER, J. y BÜCKLE, G., (1969): Z. Krebsforsch., 73, 54.
- SANDER, J. y SCHWEINSBERG, F., (1972): Zentralbl. Bakteriol. (Orig. B.), 156, 299.
- SANZ EGAÑA, C., (1967): "Enciclopedia de la carne", Ed. Espasa-Calpe, S.A., Madrid, p. 519.
- SANZ PEREZ, B., (1977): Afinidad, 34, (351), 591.
- SANZ PEREZ, B., MARCOS, A. y GARCIA, A., (1966): Anal. Bromatol., 14, 121.
- SANZ PEREZ, B., RODRIGUEZ, P., TORMO, J. y LOPEZ, P., (1975): Proc. 20th World Vet. Congr., Tessaloniki, Grecia, p. 849.
- SCANLAN, R.A., (1975): CRC Crit. Rev. Food Technol., 5, 357.
- SCHAARSCHMIDT, H., (1969): "Morphologische und biologische Nachweismethoden der Östrogenbehandlung von Mastkälbern", München, Universität, Tierärztl. Fak. Diss.
- SCHIAVELLO, A., PERLASCA, M. y CANTONI, G., (1975): Ind. Alimentari., 14, 98.

- SCHULLER, P.L., (1967): J. Chromatogr., 31, 237.
- SCHULLER, P.L. y STEPHANY, R.W., (1973): "Dansylscreeningtest voor hormonen en hormonoiden", EEG-document, 690/VI/73.
- SCHULLER, P.L. y VEEN, E., (1967): J. Ass. Off. Anal. Chem., 50, 1127.
- SCHWARZE, E. y SCHRÖDER, L., (1972): "Compendio de Anatomía Veterinaria", tomo III, Ed. Acribia, Zaragoza, p. 176.
- SEAL, R., LUCAS, T. y Co. LTD., (1978): Int. Flav. Food Addit., 9, 111.
- SEBRANEK, J.G., CASSENS, R.G., HOEKSTRA, W.G. y WINDER, W.C., (1973): J. Food Sci., 38, 1220.
- SELENKOW, H.A. y COLLAÇO, F.M., (1961): Clin. Pharmacol. Therap., 2, 191.
- SEN, N.P., DONALDSON, B., SEAMAN, S., IYENGAR, J.R. y MILES, W.R., - (1976): J. Agr. Food Chem., 24, 397.
- SEN, N.P., SMITH, D.C., MOODIE, C.A. y GRICE, H.C., (1975): Food Cosmet. Toxicol., 13, 423.
- SEN, N.P., SMITH, D.C. y SCHWINHAMER, L., (1969): Food Cosmet. Toxicol., 7, 301.
- SEN, N.P., SMITH, D.C. y SCHWINHAMER, L., (1970): Can. Inst. Food Technol. J., 3, 66.
- SHINN, M.B., (1941): Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 13, 33.
- SISSON, S. y GROSSMAN, J.D., (1975): "Anatomía de los Animales Domésticos", 4ª ed., Ed. Salvat, Barcelona, p. 533.
- SITAR, D.S. y THORNHILL, D.P., (1972): J. Pharmacol. Exper. Therap., 183, 440.
- SITAR, D.S. y THORNHILL, D.P., (1973): J. Pharmacol. Exper. Therap., 184, 432.
- SKJELKVALE, R., TJABERG, T. y VALLAND, M., (1974): J. Food Sci., 39, 520.
- SMITH, A.K. y RACKIS, J.J., (1957): J. Am. Chem. Soc., 79, 633.

- SMITH, W.G. y Mc.NEIL, E.E., (1972): Anal. Chem., 44, 1084.
- SOLLMANN, T., (1957): "A Manual of Pharmacology", 8th ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- SOUTHGATE, D.A.T., (1976): "Determination of Food Carbohydrates", - Applied Science Publ., London, p. 53.
- SPENCER, R., (1969): "Food Poisoning due to Clostridia: The factors affecting the survival and growth of food poisoning Clostridia in cured foods", B.F.M.I.R.A., Scientific and Technical Survey nº 52, Leatherhead, Surrey, Inglaterra.
- STALDER, M.J., (1964): M.S. Thesis, University of Illinois, Urbana, Ill.
- STOB, M., ANDREWS, F.N., ZANOW, M.N. y BEESON, W., (1954): J. Animal - Sci., 13, 138.
- STOEWESAND, G.S., (1972): "Environmental contaminants in foods", Proc. 6th Ann. Symp., 1971, Geneva, New York, p. 12.
- SWAIN, J.W., (1972): Ph. D. Thesis, Univ. Missouri, Col.
- TAKAYAMA, K., MacLENNAN, D.H., TZAGOLOFF, A. y STONER, C.D., (1966): Arch. Biochem. Biophys., 114, 223.
- TANNENBAUM, S.R., (1972): Proc. 25th Reciprocal Meat Conf., Ames, Iowa, June 19, 1972.
- TARAS, M.J., (1958): "Colorimetric Determination of Nonmetals", Interscience Publ., New York, p. 124.
- TEICHMANN, B. y SCHRAMM, T., (1973): Akademie der Wissenschaften der D.D.R. Zentralinstitut für Krebsforschung, Berlin-Buch, p. 124.
- THACKER, L. y BROOKS, J.B., (1974): Infect. Imm., 9, 648.
- THEWLIS, B.H., (1968): Food Cosmet. Toxicol., 6, 822.
- THORBERG, J.V., (1948): Acta Endocrinol., Suppl. 2, 1.
- THORNEYCROFT, I.H., TILLSON, S.A., ABRAHAM, G.E., SCARAMUZZI, R.J., -

- CALDWELL, B.V., PERON, F. y CALDWELL, B., (1970): "Immunologic methods in steroid determination", Appleton, New York, p. 63.
- THORSON, B., SKAARE, K. y HØYEM, T., (1969): Nord. Vet. Med., 21, 436.
- TIECCO, G., (1961): Vet. Ital., 12, 447.
- TIECCO, G. y VALFRE, F., (1970): Atti Soc. Ital. Sci. Vet., 24, 55.
- TOMBS, M.P., (1967): Plant Physiol., 42, 797.
- TOWNSEND, W.E., (1973): J. Animal Sci., 36, 202.
- TRAUTMANN, A. y HILL, H., (1950): Deut. Tierärz. Woch., 57, 172.
- TRENKLE, A.H., (1969): En "The Use of Drugs in Animal Feeds", Natl. - Acad. Sci. Publ. Nº 1679, Washington, D.C., p. 150.
- TRUHAUT, R., (1961): Rev. Hyg. Méd. Soc., 9, 667.
- UMBERGER, E.J., (1975): Toxicology, 3, 3.
- U.S. Department of Health Education and Welfare, (1971): Public Health Service Publication, 149.
- USHER, C.D. y TELLING, G.M., (1975): J. Sci. Food Agric., 2, 1793.
- VALDECANTOS, A. y GARCIA MATAMOROS, E., (1964): Rev. Frío, 4, 151.
- VALETTE, J.P. y FERRANDO, R., (1973): Ann. Fals. Exp. Chim., 804, 210.
- VAN WAES, H., (1973): Rev. Agr. (Brussels), 26, 435.
- VAN WEEMEN, B.K., (1974): Tesis Doctoral, Univ. Groningen, Holanda.
- VU, B.N. y BOURRINET, P., (1976): Labo-Pharma, Problemes Tech., Nº 259, 977.
- WALDSCHMIDT, M., (1972): Arch. Lebensmittelhyg., 23, 76.
- WASSERMAN, A.E. y TALLEY, F., (1972): J. Food Sci., 37, 536.
- WATTS, B.M., (1957): Proc. 9th Res. Conf., Am. Meat Inst. Found., Univ. Chicago, p. 61.
- WESTEEN, R.W. y KURAMOTO, S., (1964): U.S. Patent. 3,118,959, January 21, (A favor de General Mills, Inc.).

- WESTERBERG, D.O., (1973): Proc. 26th Ann. Reciprocal Meat Conf., A.M.S.A. National Livestock and Meat Board, Chicago, p. 45.
- WILDANGER, W., (1975): Z. Lebensm. Untersuch. Forsch., 158, 1.
- WILLIAMS, L.F., (1950): En "Soybeans and Soybean Products", Vol. I, - (K. Markley, ed.), Interscience Publ., Inc., New York.
- WOLF, W.J., (1969): Baker's Dig., 43, 30.
- WOLF, W.J., (1970): J. Agr. Food Chem., 18, 969.
- WOLF, W.J. y COWAN, J.C., (1971): CRC Crit. Rev. Food Technol., 2, 81.
- WOLFF, I.A. y WASSERMAN, A.E., (1972): Science, 177, 15.
- WORK, T.S., (1964): J. Mol. Biol., 10, 544.
- WURZBURG, D.B., (1968): En "Handbook of Food Additives", (T.E. Furia, ed.), CRC Press, Cleveland, Ohio.
- ZIEMBA, J.V., (1969): Food Eng., 41, 72.

Fe de erratas, página 193.

5.- Los derivados del tiouracilo más frecuentemente detectados son el metil-tiouracilo y el propil-tiouracilo, que aparecen en el 95,5% y en el 47,2% de las muestras analizadas, respectivamente.

